

Série A, N° 2955

N° d'Ordre :

3827

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Henri CHALOPIN

1^{re} THÈSE. — SUR LA DÉNATURATION DE QUELQUES HÉMO-
PROTÉINES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 20 Janvier 1956 devant la Commission d'examen

MM. WURMSER... . *Président*

FROMAGEOT.

BUSER... .

} *Examineurs*

Série A, N° 2955

N° d'Ordre :

3827

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Henri CHALOPIN

1^{re} THÈSE. — SUR LA DÉNATURATION DE QUELQUES HÉMO-
PROTÉINES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 20 Janvier 1956 devant la Commission d'examen

MM. WURMSER. . . *Président*

FROMAGEOT. . .

BUSER

} *Examineurs*



FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen..... J. PERES

G. JULIA *Analyse supérieure et Algèbre supérieure.*
 E. DARMOIS *Enseignement de Physique*
 R. LEVY *Physiologie comparée*
 FOCH *Mécanique physique et expér.*
 PAUTHENIER *Electrotechnique générale*
 DE BROGLIE *Théories physiques*
 JOB *Chimie générale*
 PRENANT *Anatomie et Histol. comparées*
 GARNIER *Géométrie supérieure*
 PERES *Mécanique des fluides et appl.*
 LAUGIER *Physiologie générale*
 M. CURIE *Physique (P.C.B.)*
 BARRABE *Mécanique générale*
 G. DARMOIS *Géol. des prob. et Phys. Math.*
 J. BOURCART *Géogr. Phys. et Géol. dynam.*
 Mme JOLIOT-CURIE *Physique nucléaire et Radioactivité*
 PLANTEFOL *Botanique*
 CABANNES *Recherches physiques*
 GRASSE *Evol. des êtres organisés*
 PREVOST *Chimie organique*
 BOULIGAND *Application de l'analyse à la Géométrie*
 CHAUDRON *Chimie appliquée*
 WYART *Minéralogie*
 TEISSIER *Zoologie*
 MANGENOT *Biologie végétale*
 P. AUGER *Physique quantique et Relat.*
 MONNIER *Physiologie des fonctions.*
 PIVETEAU *Géologie.*
 ROCARD *Physique (E.N.S.)*
 H. CARTAN *Mathématiques (E.N.S.)*
 LAFFITTE *Chimie générale*
 FAVARD *Géol. Struct. et Géologie appl.*
 COULOMB *Physique du Globe*
 Mlle COUSIN *Biologie animale (P.C.B.)*
 CHRETIEN *Chimie minérale*
 P. DRACH *Zoologie*
 KASTLER *Physique*
 EPHRUSSI *Génétique*
 WURMSER *Biol. Physico-chimique*
 RIVIERE *Géologie (S.P.C.N.)*
 GAUTHERET *Biologie végétale (P.C.B.)*
 LUCAS *Physique*
 A. THOMAS *Biologie cellulaire*
 ARNULF *Optique appliquée*
 M. MORAND *Physique*
 SOLEILLET *Physique*
 FORTIER *Mécan. expér. des fluides*
 DANJON *Astronomie*
 FROMAGEOT *Chimie biologique*
 LAPORTE *Phys. génér. et radioact.*
 JANET *Méc. anal. et Méc. céleste*
 PETIT *Biologie maritime*
 QUENEY *Météor. et dyn. atmosphér.*
 GALLIEN *Embryologie*
 EICHHORN *Biologie Vég. (P.C.B.)*
 DE CUGNAC *Biologie Vég. (P.C.B.)*
 M^{lle} CAUCHOIS *Chimie Physique*

THELLIER *Physique du Globe*
 AUDUBERT *Electrochimie*
 L'HERITIER *Génétique*
 GRIVET *Radioélectricité*
 PONCIN *Mécanique des fluides*
 THIRY *Mécanique appliquée*
 DUBREIL *Arith. et théor. des nomb.*
 QUELET *Chimie organique*
 CAGNIARD *Géophysique appliquée*
 CHAMPETIER *Chimie macromoléculaire*
 CUVILLIER *Géol. Struct. et Géol. appliquée.*
 JUNG *Pétrographie*
 TRILLAT *Chimie physique*
 WIEMANN *Chimie (M.P.C.)*
 JACQUINOT *Spectroscopie et physique céleste*
 VASSY *Physique de l'atmosphère*
 DESTOUCHES *Théories physiques*
 M. PRUVOST *Géologie*
 AMIEL *Chimie (P.C.B.)*
 HOCART *Minéralogie*
 J.P. MATHIEU *Physique (P.C.B.)*
 COUTEAUX *Biologie animale (P.C.B.)*
 MAY *Biologie animale (P.C.B.)*
 CHOQUET *Calc. diff. et Intégral*
 FELDMANN *Biologie (P.C.B.)*
 GUINIER *Physique (P.C.B.)*
 JOST *Biologie (P.C.B.)*
 FORTET *Calc. des probabilités*
 SCHWARTZ *Méth. Math. de la Physique*
 CHOUARD *Physiologie végétale*
 MALAVARD *Aviation*
 BRELOT *Calcul différentiel*
 NORMAND *Chimie (P.C.B.)*
 BENARD *Chimie (P.C.B.)*
 BUVAT *Botanique (E.N.S.)*
 DUGUE *Statistiques mathématiques*
 GELOSO *Chimie (S.P.C.N.)*
 SOULAIRAC *Psychophysiologie*
 ULRICH *Physiologie végétale*
 MARECHAL *Optique théorique et appl.*
 KIRRMANN *Théories chimiques*
 CHADEFAUD *Botanique*
 DESTRIAU *Physique (M.P.C.)*
 M^{lle} LE BRETON *Physiologie générale*
 SALEM *Mathématiques générales*
 ESCLANGON *Physique (P.C.B.)*
 LELONG *Mathématiques générales*
 DEVILLERS *Anatomie et Histologie comparées*
 EHRESMANN *Topologie Algébrique*
 FRANÇON *Physique (M.P.C.)*
 GLANGEAUD *Géographie Physique et Géologie dynamique*
 GODEMENT *Mathématiques (M.P.C.)*
 PISOT *Calcul des Probabilités*
 ROCH (E.) *Géologie*
 SCHATZMANN *Astrophysique*
 TERMIER *Paléontologie stratigraphique.*
 ZAMANSKY *Mathématiques générales*

Secrétaire Général C. MONIER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552423_0040

INTRODUCTION

On peut envisager les modifications que subissent les protéines sous deux aspects. Le premier évoque les réactions d'ionisation, de salification, d'addition ; ce sont les réactions de fonctions que décrit la chimie des "petites" molécules. Au deuxième se rattachent les dénaturations (3, 9, 10, 11, 12, 19) : transformation de l'architecture moléculaire, elles consistent en remaniements des plissements de la chaîne polypeptidique.

Une partie des groupes chimiques de la protéine situés à l'intérieur de la molécule est normalement empêchée de réagir pour des raisons stériques. On explique ainsi que la configuration des chaînes polypeptidiques sous leurs formes "natives" ou sous leurs formes dénaturées est responsable de beaucoup de propriétés de la molécule. On ne peut douter qu'une étude minutieuse de la dénaturation doive fournir des éléments importants pour l'étude des structures. A ce point de vue il paraît particulièrement important de comparer entre elles dans leur comportement des protéines étroitement apparentées vis à vis des mêmes agents dénaturants et avec les mêmes tests. Il nous a paru que les hémoprotéines, bien qu'elles aient fait déjà l'objet de nombreux travaux (7, 9, 10) devaient être encore examinées sous cet angle. Cette étude expérimentale est l'objet du présent travail.

Les hémoprotéines possèdent pour groupement prosthétique des hèmes. Elles se distinguent entre elles par l'hème et par la protéine liée à l'hème. Chaque hémoprotéine possède une courbe spectrale caractéristique dont les modifications permettent de mesurer des arrangements intramoléculaires. C'est ce que j'ai fait au cours de ce travail.

L'hémoprotéine peut prendre plusieurs formes qui se distinguent par l'état du groupement prosthétique. Celui-ci constitue l'élément essentiel du groupement chromogène, mais il conditionne bien d'autres propriétés de la molécule, notamment sa stabilité.

Lorsque l'on considère les états du groupement prosthétique, on les classe en deux groupes. Le premier comprend les états dans lesquels le fer est divalent, le second ceux dans lesquels le fer est trivalent. Ainsi dans les cas des dérivés de l'hémoglobine quand le fer est divalent on peut avoir l'hémoglobine, elle peut fixer l'oxygène pour donner l'oxyhémoglobine et ces deux formes résistent bien aux agents dénaturants. Quand le fer est trivalent on a la méthémoglobine très sensible aux agents dénaturants. On connaît des formes dénaturées à fer divalent, mais la différence de sensibilité à la dénaturation est telle qu'une forme oxydée peut retrouver après sa réduction dans le milieu dénaturant les caractères de la protéine native et en particulier la propriété de fixer réversiblement l'oxygène.

L'absorption de la lumière dans la région visible du spectre par les hémoprotéines est modifiée en présence de dénaturants. L'étude du spectre constitue un moyen de déceler une action du dénaturant. Cependant cette étude n'a trait qu'à l'un des aspects de la modification apportée par le dénaturant. Portant sur le groupement chromogène, elle ne suffit à caractériser la transformation moléculaire que si la protéine donne une

seule réaction et un seul produit avec le dénaturant, c'est-à-dire si la réaction se fait par "tout ou rien".

On possède des arguments favorables à l'existence d'une dénaturation par "tout ou rien": Dans le cas de la dénaturation réversible de la méthémoglobine de boeuf par le salicylate de sodium qui a été étudiée par Anson et Mirsky (1) on constate l'existence de seulement deux formes spectrales de la méthémoglobine, la forme native et une forme dénaturée unique. Toutes les courbes spectrales obtenues expérimentalement sont, soit celle de la méthémoglobine native, soit celle de la méthémoglobine dénaturée, soit encore, des courbes qu'on peut toujours interpréter comme résultant d'un mélange de forme native et de forme dénaturée. En outre, argument important, Anson et Mirsky ont montré que le rapport des concentrations de la forme dénaturée et de la forme native varie en fonction de la concentration en salicylate comme si la réaction était unique. Enfin cette transformation se ferait sans échange de chaleur.

Mais il existe aussi des arguments défavorables à l'existence d'une réaction réversible par "tout ou rien" (9, 13, 14). Roberts (13) a repris l'étude de la dénaturation de la méthémoglobine par le salicylate : Au moyen d'un calorimètre, il a mesuré la quantité de chaleur dégagée au cours de la "dénaturation". La réaction à laquelle correspond la chaleur dégagée n'a de relation apparente ni avec les changements de spectres ni naturellement avec la réaction sans échange de chaleur étudiée par Anson. D'autre part la carboxyhémoglobine dont le spectre n'est pas modifié par de faibles concentrations en salicylate, donne des phénomènes thermiques très peu différents de ceux que donne la méthémoglobine dont le spectre est modifié.

On peut conclure que la notion de "tout ou rien" est excessive puisqu'il y a deux phénomènes distincts au moins dans le cas de la mét-hémoglobine : le premier se manifeste par un changement de l'absorption spectrale et présente une chaleur de réaction nulle, l'autre se manifeste par des échanges de chaleur avec l'extérieur.

Au cours de ce travail, je me suis efforcé d'apporter de nouveaux documents sur cette question. J'ai étudié principalement l'action du salicylate sur l'oxyhémoglobine, l'hémoglobine et la méthémoglobine humaine, la myoglobine de cheval et le cytochrome C de boeuf. J'ai aussi utilisé l'action dénaturante du dodécylsulfate et essayé l'action du tween 80 sur l'hémoglobine dénaturée.

J'ai entrepris ce travail sous la direction de Monsieur le Professeur Wurmser. Je veux lui exprimer ici ma reconnaissance ainsi qu'à Monsieur le Professeur Fromageot pour ses nombreux conseils.

Je dois à Madame Filitti-Wurmser et à Monsieur Tonnelat la connaissance de plusieurs techniques physicochimiques.

Ayant travaillé dans une ambiance sympathique, j'en remercie toutes les personnes qui fréquentent le service de Biologie physicochimique.

J'exprime ma reconnaissance au Centre National de la Recherche Scientifique, qui m'a permis de réaliser ce travail.

HEMOGLOBINE HUMAINE ET SES DERIVES

I . OXYHEMOGLOBINE

Il est bien connu que les protéines sont beaucoup plus stables en solution concentrée qu'en solution diluée. On admet généralement qu'il s'agit d'un effet non spécifique relié à l'accroissement de la constante diélectrique ou à une protection contre les actions de surface.

J'ai observé moi-même précédemment, au cours d'expériences faites en collaboration avec Madame Colson-Guastalla (4) que la méthémoglobine se dénature sous l'influence de la seule dilution. La réaction est limitée et la dénaturation incomplète d'après le test du spectre ; le taux de dénaturation lorsque la réaction est pratiquement arrêtée dépend du taux de dilution. Il m'a paru très probable qu'il existait ici une action spécifique de la protéine.

La méthémoglobine étant trop facilement dénaturable pour se prêter à l'expérimentation, je me suis adressé à l'oxyhémoglobine pour voir si la dilution rendait la protéine plus sensible. Pour cela, j'ai fait les deux séries d'expériences suivantes :

1°) Des cristaux servant de réserve d'oxyhémoglobine sont mis en suspension dans une solution de phosphates. Par agitation, ils s'y dissolvent lentement, donnant d'abord une solution très pauvrement concentrée. C'est sur cette solution très peu concentrée d'oxyhémoglobine que le salicylate agit. Son action dénaturante détruit une partie de l'oxyhémoglobine dissoute, modérant ainsi l'augmentation de la concentration en protéine native. La protéine dénaturée est insolubilisée par les sels.

Avant la mise en suspension des cristaux, on a pris soin de les mettre en équilibre au moyen de lavages répétés avec une solution plus concentrée en phosphates et en salicylate que toutes celles qui serviront ensuite. On est assuré ainsi d'opérer toujours par dissolution.. Puis, pendant 20 heures, les cristaux sont agités dans une solution de phosphates contenant du salicylate de sodium à des concentrations variant suivant les essais entre 0 et 10^{-2} molécule par litre. Après 20 heures, on examine les diverses suspensions et on dose au spectrophotomètre l'oxyhémoglobine dissoute.

2°) Une suspension concentrée de cristaux lavés au phosphate et au salicylate est dialysée contre un grand volume de solution de phosphates contenant, suivant les essais, plus ou moins de salicylate. Dans ce cas, les cristaux se dissolvant dans peu de liquide, la concentration de l'oxyhémoglobine dissoute croît plus rapidement qu'avec la technique précédente : le salicylate ne peut agir sur la protéine diluée que pendant un temps très court et le résultat de son action doit être moins sensible.

Technique expérimentale

Elle comprend :

- 1° Préparation de l'oxyhémoglobine
- 2° Dosages
- 3° Première série d'expériences
- 4° Deuxième série d'expériences

1° Préparation

Le sang conservé est décanté. 100 cm³ environ de la suspension concentrée de globules dans le plasma sont agités dans un tube à centrifugation d'un litre avec 650 cm³ de solution de ClNa à 10 p. 1000. On centrifuge 20 minutes à 600 g., à la température de + 4°C. Le liquide trouble surnageant est éliminé et on le remplace par un poids égal de solution de ClNa à 10 p. 1000. Trois lavages, suivis chacun d'une centrifugation à 600 g., éliminent le plasma et les éléments figurés autres que les hématies. Un quatrième lavage est suivi d'une centrifugation à 3.000 g. pour concentrer la suspension de globules rouges. Après avoir éliminé le liquide clair surnageant, on additionne la suspension concentrée de globules rouges d'un volume égal d'eau distillée ; on agite et on laisse deux heures à + 4°C. On ajoute alors un tiers du volume de toluène et on agite énergiquement avec une baguette de verre. Après un quart d'heure, on agite une seconde fois. On constate à ce moment une résistance aux mouvements de la baguette de verre car le milieu est devenu une émulsion visqueuse. Parfois la viscosité du milieu n'augmente pas sensiblement parce que l'hémolyse est incomplète. Il convient d'ajouter par petites fractions, de

l'eau distillée pour obtenir le résultat cherché. On filtre l'émulsion sur deux filtres mouillés avec de l'eau distillée. Le filtrat clair est agité avec un quart de son volume de toluène puis laissé un quart d'heure en contact ; agité à nouveau au moyen d'une baguette de verre, il est aussitôt versé sur deux filtres mouillés. Il faut arrêter la filtration avant que le toluène ne passe. S'il arrive que le filtrat contienne quelques débris de stromas, on l'agite à nouveau avec du toluène puis on filtre dans les mêmes conditions.

2° Dosage de l'oxyhémoglobine

J'ai utilisé le spectre d'absorption. Le coefficient d'extinction de la solution d'oxyhémoglobine, pour la longueur d'onde de $5.450 \text{ \AA}$., pour une épaisseur de 1 cm., est 14,5 par milliatome de fer au litre. En outre, l'étude du spectre entre 6.000 et $6.500 \text{ \AA}$. permet de doser les quantités de méthémoglobine qu'elle contient.

Les cristaux sont préparés en partant d'une solution d'oxyhémoglobine que l'on dialyse contre une solution de phosphates mono- et dipotassiques à pH 7,05. La concentration atteint finalement 2,8 M. La température est $+ 4^{\circ}\text{C}$. On équilibre les cristaux par lavages successifs et centrifugations contre une solution de phosphates mono- et disodiques 2,33 M à pH 7,05, renfermant du salicylate à la concentration de $M \times 10^{-2}$.

3° Première série d'expériences

1 cm³ de suspension cristalline (titrant environ 3×10^{-3} atomes de fer par litre) est mélangé avec 9 cm³ d'une des solutions devant les dissoudre partiellement. Ces solutions sont :

- 1) phosphates mono- et disodiques 1,83 M (en acide phosphorique) pH 7,05
- 2) la même contenant en outre 5×10^{-3} M de salicylate

3) la même contenant en outre 1×10^{-2} M de salicylate.

La température de l'expérience est $+ 4^{\circ}\text{C}$. On agite pendant 20 heures (c'est le temps que l'on peut considérer comme nécessaire pour obtenir un équilibre). Dès que l'agitation cesse, les cristaux montent à la surface et dans les tubes qui contiennent du salicylate ils sont accompagnés de protéine amorphe dénaturée irréversiblement. On filtre et on dose au spectrophotomètre l'hémoglobine dissoute. Le tableau I représente les résultats obtenus.

TABLEAU I

Concentration en salicylate	Concentration de l'hémoglobine dissoute après 20 heures en Mole/litre $\times 10^{-5}$
0	14
	15
	14,5
	14
	15
0,005 M	2,95
	2,86
	2,74
	3,16
	2,90
0,01 M	1,39
	1,31
	1,36
	1,72
	1,52

En présence d'une quantité relativement petite de cristaux, on voit que la concentration d'oxyhémoglobine restée dissoute - que l'on peut appeler solubilité apparente - dépend de la concentration du salicylate.

4° Deuxième série d'expériences

Pour étudier l'action du salicylate en présence d'une quantité relativement grande de cristaux d'oxyhémoglobine, il est nécessaire de travailler sur de petits volumes. C'est pourquoi j'ai mis au point une micro-méthode :

On introduit $0,2 \text{ cm}^3$ de la purée cristalline préparée précédemment dans un sac de collodion moulé dans un tube à hémolyse et on met à dialyser contre une solution de phosphate et de salicylate. Après agitation pendant 20 heures à $+ 4^\circ\text{C}.$, on sépare les cristaux de la solution d'oxyhémoglobine. Le sac de collodion est traversé de part en part au moyen d'une aiguille de verre, le liquide coule le long de l'aiguille et emplit le petit tube à centrifuger déjà fixé à son flotteur de liège. Les flotteurs numérotés portant leur tube sont introduits dans de gros tubes à centrifuger contenant de l'eau à la température de l'expérience.

Après une demi-heure de centrifugation à 4.000 g. (la température de la centrifugeuse est maintenue constante à $+ 4^\circ\text{C}.$), on sort les tubes et on constate que les cristaux bien séparés sont montés à la surface. On saisit le tube de verre par l'intermédiaire d'un tube en caoutchouc (pour éviter l'échauffement par les doigts) et on donne un trait de scie en-dessous des cristaux. Le tube coupé, on obtient un minuscule tube à essais contenant un liquide limpide. On prélève un peu de ce liquide au moyen d'une micropipette à striction (25 mm^3) et on le verse dans le

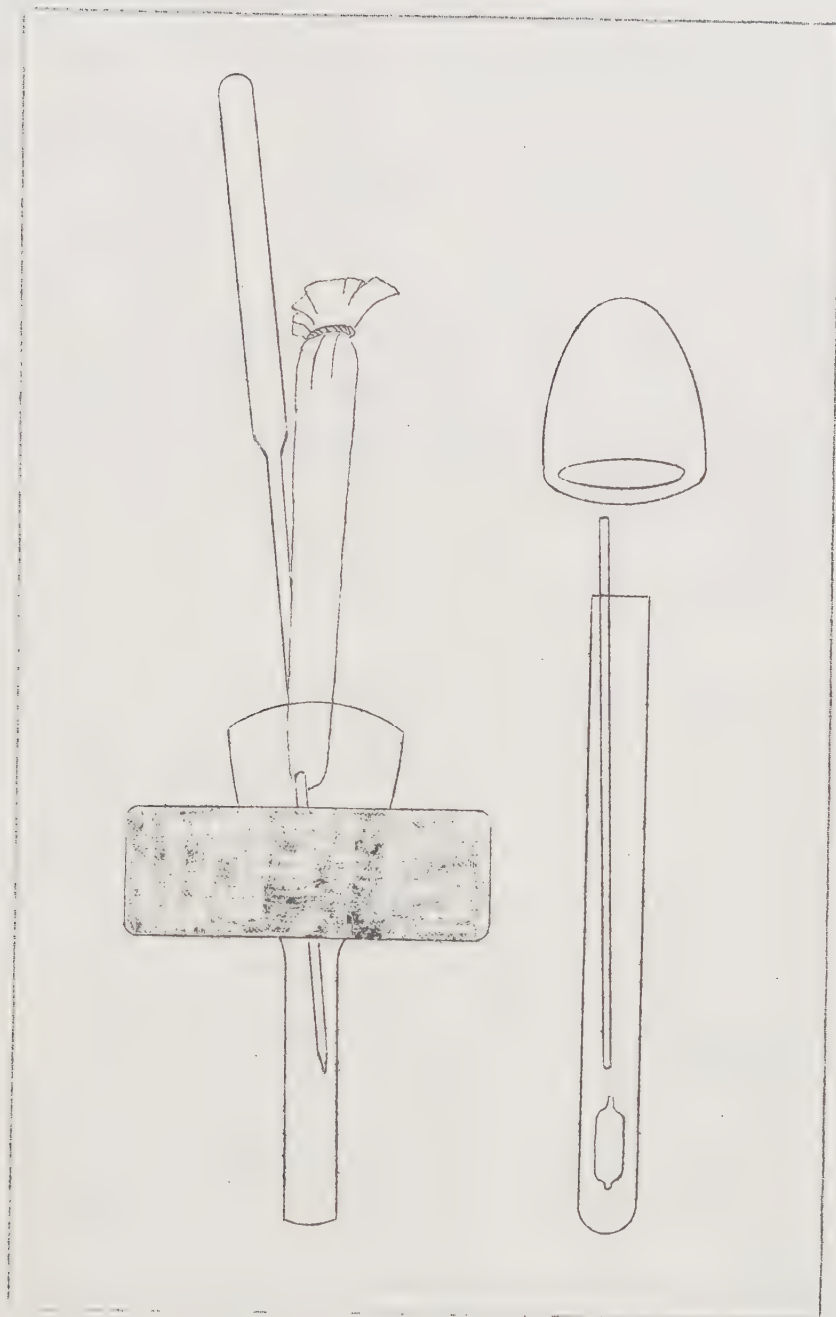


Figure 1.

tube représenté à droite de la figure 1. Un fil de verre introduit dans le tube permet au liquide de gagner le fond tandis que l'air s'élimine. On prélève au moyen de la même micropipette un même volume d'eau bidistillée et on l'ajoute à la solution d'hémoglobine contenue dans le tube ; lorsque le liquide s'est écoulé, on enlève le fil de verre afin de pouvoir renverser le tube sans que le liquide coule. On couvre le tube de son couvercle et on retourne vingt fois. Le liquide reste au fond du tube mais un petit flotteur en verre soufflé brasse les liquides et assure un mélange homogène. Désormais la concentration saline est trop faible pour que l'oxyhémoglobine précipite en se réchauffant ; le spectre d'absorption sera étudié à la température du laboratoire.

Le dosage est fait par l'étude du spectre d'absorption de la solution sous 1 mm d'épaisseur dans une cellule cylindrique dont le diamètre est de 3 mm. La cellule se compose de trois lames de verre d'une épaisseur de 1 mm, polies optiquement et posées l'une sur l'autre. La lame moyenne est percée à l'intersection de ses diagonales d'un trou de 3 mm de diamètre qui constitue le logement de la solution à étudier.

La lumière qui sert à l'analyse spectrale doit être condensée sur une très petite cuve. Aussi pour éviter un échauffement excessif, la cuve n'est traversée que par le faisceau qui sort d'un monochromateur. L'image de la fente de sortie est projetée sur la cuve au moyen d'un objectif de microscope. La lumière qui a traversé la cuve est reprise par un autre objectif et dirigée vers une cellule photoélectrique automultiplicatrice. Le faisceau convergent sur la cuve a à peu près la forme d'un cône dont les génératrices ne font pas avec l'axe un angle

supérieur à 15° . On peut encore dans ces conditions définir la densité optique à 1 pour cent près. La sensibilité du montage permet de pratiquer un dosage et de déceler 1 $\mu\text{g.}$ d'oxyhémoglobine dans 20 mm^3 de solution.

Au moyen de cette technique j'ai pu mesurer la solubilité apparente des suspensions cristallines concentrées en présence de salicylate. Les expériences sont faites à la température de $+4^{\circ}\text{C.}$, les cristaux ont été préalablement lavés au moyen d'une solution de phosphate de potassium 2,8 M (en acide phosphorique) à pH 7,05, contenant du salicylate à la concentration 5×10^{-3} M. Les solutions qui servent aux essais de dissolution sont au même pH (7,05) et à la concentration 1,8 M en phosphates. Le tableau II indique la concentration de l'oxyhémoglobine dissoute. On a dialysé pendant 20 heures une suspension riche en cristaux contre des solutions contenant des quantités différentes de salicylate.

TABLEAU II

N°	Concentration du salicylate	Concentration de l'oxyhémoglobine dissoute
1	0	16
2	0,001 M	13,5
3	0,002 M	13,5
4	0,004 M	13,5
5	0,005 M	13,5

Les dosages spectrophotométriques de l'oxyhémoglobine dissoute montrent (tableau II) que le salicylate à ces concentrations n'a pas d'action sur la solubilité apparente de l'oxyhémoglobine. Il ne dénature pas d'une façon sensible les solutions d'oxyhémoglobine obtenues à partir d'une très forte quantité de cristaux.

Conclusions

Si l'on compare les tableaux I et II, il apparaît nettement que la résistance à l'action dénaturante du salicylate est en relation avec la concentration de la solution d'oxyhémoglobine. J'ai pu encore vérifier le fait par l'expérience suivante : On perce un petit trou au moyen d'une aiguille très fine dans des sacs à dialyse remplis comme précédemment d'une purée cristalline et on dialyse contre des solutions contenant phosphates et salicylate aux concentrations indiquées plus haut. Après une agitation de 20 heures, on observe un liquide coloré et limpide à l'intérieur des sacs tandis qu'à l'extérieur, où la protéine a diffusé très lentement par le petit trou, le liquide est troublé par un précipité de protéine dénaturée mais il ne contient pas d'oxyhémoglobine en solution.

II . METHEMOGLOBINE HUMAINE

J'ai étudié l'action de quelques agents dénaturants sur la méthémoglobine humaine :

- 1° Action du salicylate de sodium
- 2° Action du dodécylsulfate de sodium
- 3° Action du dodécylsulfate de sodium en présence d'urée.

1° Action du salicylate de sodium sur la méthémoglobine humaine

L'étude de l'action du salicylate de sodium sur la méthémoglobine de boeuf a déjà fait l'objet de plusieurs travaux. Nous avons vu que pour Anson et Mirsky (1), cette dénaturation (test du spectre) est une réaction réversible par tout ou rien. En outre, l'équilibre dont la position est déterminée par l'examen du spectre d'absorption ne se déplace pas à l'occasion d'un changement de température. D'autre part, Roberts (13) a obtenu des résultats très différents en étudiant l'action du salicylate sur la méthémoglobine de boeuf par une méthode calorimétrique : il a mis en évidence des échanges de chaleur avec l'extérieur et n'a trouvé aucun parallélisme entre les modifications du spectre et les échanges de chaleur.

Mes propres recherches ont porté sur l'action du salicylate sur la méthémoglobine humaine. Après avoir donné une méthode de préparation

de la méthémoglobine, j'indique successivement : les modifications spectrales ; la solubilité de la méthémoglobine en présence de salicylate ; l'action du salicylate sur le spectre de la méthémoglobine en fonction du temps ; la réversibilité de la dénaturation ; les effets thermiques.

Préparation

On oxyde l'hémoglobine par le ferricyanure de potassium ; 320 mg. de ferricyanure de potassium oxydant 1 milliatome de fer. En pratique, on utilise 360 mg. de ferricyanure par milliatome de fer, soit un excès de 10 %. Pour obtenir une réaction rapide, il est important de mettre le ferricyanure en contact avec l'hémoglobine et non avec l'oxyhémoglobine. Pour cela on opère sous vide dans un tube de Thunberg à deux compartiments. On introduit séparément 9 cm³ de la solution d'oxyhémoglobine et la quantité calculée de ferricyanure dissoute dans 1 cm. d'eau. On fait un vide partiel qui produit de la mousse. On interrompt la communication avec la pompe jusqu'à ce que la mousse ait presque disparu. A nouveau, pendant un instant on améliore le vide ; puis, la communication étant fermée, on agite doucement. Après plusieurs mises en communication avec la pompe la solution ne mousse plus.

L'oxyhémoglobine est passée à l'état d'hémoglobine. On mélange alors le liquide des deux compartiments. Quelques instants plus tard l'oxydation est complète. Le liquide est brun par transparence. S'il reste rougeâtre, il faut attribuer cette couleur non à un reste d'oxyhémoglobine, mais à la présence d'une méthémoglobine dénaturée qu'on trouve habituellement dans les solutions d'oxyhémoglobine vieilles, et exceptionnellement dans les solutions fraîchement préparées.

A - Modifications spectrales

Spectre d'absorption : J'ai déterminé le spectre d'absorption de la méthémoglobine humaine dissoute dans les milieux contenant des quantités diverses de salicylate de sodium. Le spectre dépend de la concentration du salicylate et du temps qui sépare l'instant du mélange de celui des mesures de densité optique. Toutefois dans les conditions de ces expériences, le spectre ne varie plus en pratique après 25 minutes.

La figure 2 représente quelques-unes des courbes obtenues. On a porté, en abscisses, les longueurs d'onde et en ordonnées les densités optiques. Les conditions expérimentales étaient les suivantes :

- température 20°C.,
- concentration de la méthémoglobine $2,6 \times 10^{-4}$ (en atomes de fer par litre),
- tampon aux phosphates de sodium contenant 0,16 molécule gramme d'acide phosphorique par litre,
- pH = 7,1 ;
- concentration en salicylate de sodium : courbe I 0 ; courbe II 0,2 M ; courbe III 0,25 M ; courbe IV 0,30 M ; courbe V 0,5 M.

Les mesures de densité ont été faites au moyen du spectrophotomètre DU de Beckman sous une épaisseur de 1 cm. Les densités ont été ramenées par le calcul à une concentration en méthémoglobine de 1×10^{-4} en atome de fer par litre en admettant la loi de Lambert.

On peut considérer que la méthémoglobine native (courbe I) se transforme en une seule forme dénaturée (courbe V) du point de vue spectral et que les courbes dont les numéros sont intermédiaires, entre

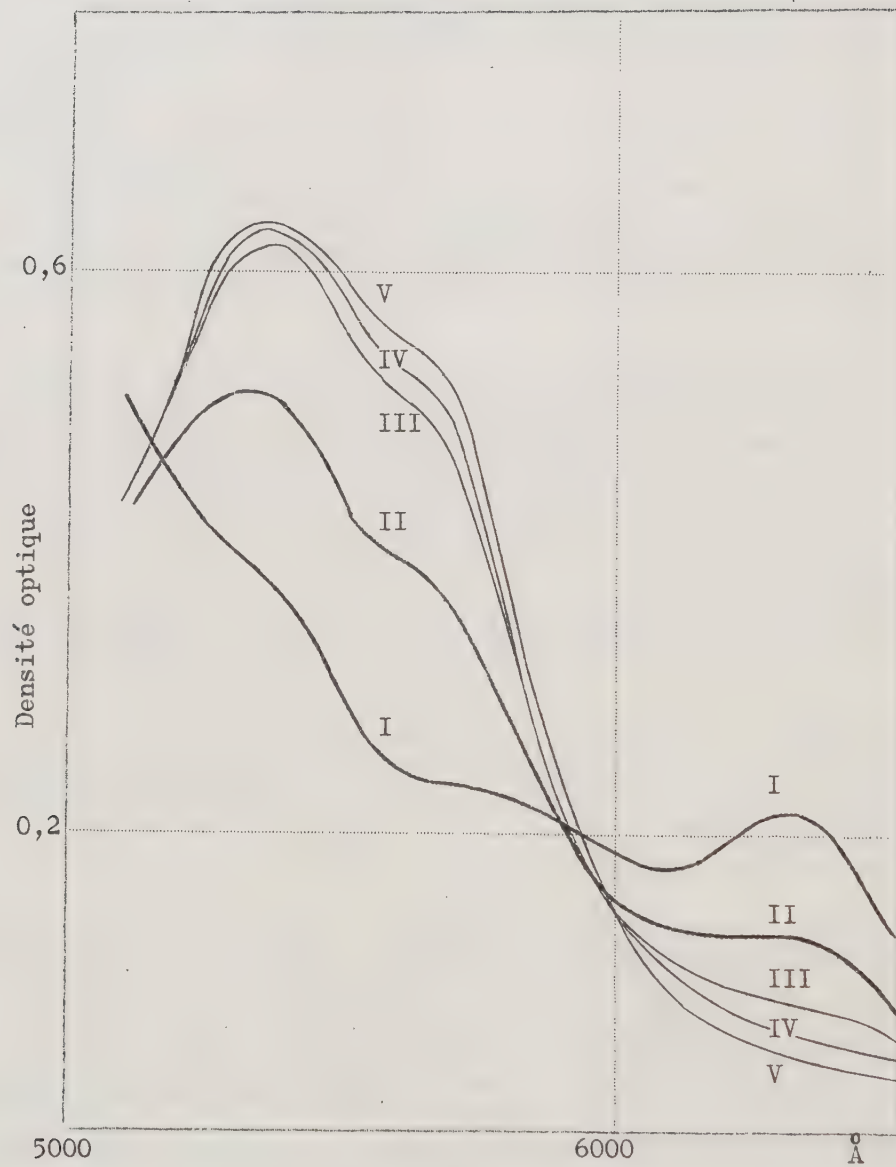


Figure 2.

Voir légende p. 17.

I et V, correspondent à des mélanges en proportions différentes des formes pures (I) et (V), le nombre total des groupements chromogènes restant le même pour chaque mélange.

En effet, soit $d_{\lambda I}$ la densité optique d'une solution de la forme native I à une certaine concentration et pour la longueur d'onde λ .

Soit $d_{\lambda V}$ la densité d'une solution de la forme V dans les mêmes conditions. Si une certaine quantité a de I disparaît et passe sous la forme V, la densité optique résiduelle de I devient $d_{\lambda I} - a d_{\lambda I}$. Il est apparu en même temps une quantité correspondante de V dont la densité totale est $a(d)V$. La densité optique du mélange est :

$$d_{\lambda} = d_{\lambda I} + a(d_{\lambda V} - d_{\lambda I}) \quad (1)$$

Si notre hypothèse de l'existence de deux formes seulement est exacte, cette expression où a (quantité de méthémoglobine transformée) est une constante, doit être valable pour toutes les longueurs d'ondes pour les courbes expérimentales II, III, IV. J'ai vérifié qu'il en était bien ainsi. Ces courbes sont donc compatibles avec l'existence d'une seule forme dénaturée (V) et d'une forme native (I). Supposons qu'il en soit bien ainsi : la mesure de la densité optique pour une seule longueur d'onde permet de déterminer le pourcentage de méthémoglobine dénaturée, si l'on connaît la concentration en méthémoglobine totale.

Pourtant, le raisonnement précédent ne prouve pas qu'il y ait seulement deux formes spectrales, la forme correspondant à I native et la forme correspondant à V, et on peut envisager la possibilité d'autres formes correspondant à des corps purs et simulant chacune un mélange de I et de V.

De toute façon, comme la relation (I) est vérifiée par l'expérience, on peut déterminer la courbe spectrale à partir d'une mesure effectuée pour une seule longueur d'onde, pourvu qu'on connaisse la concentration en méthémoglobine totale. On choisit la longueur d'onde 6.350 Å. parce qu'à cette longueur d'onde, la variation relative de densité optique est considérable au cours de la dénaturation et parce qu'aussi la variation de densité en fonction de la longueur d'onde est faible ; ce qui permet des mesures précises sans que la lumière soit rigoureusement monochromatique.

En exposant les résultats des expériences ultérieures, je supposerai qu'il n'existe que deux formes spectrales, la forme I native, la forme V dénaturée. Pour préciser l'état d'une solution de méthémoglobine, j'indiquerai le pourcentage de méthémoglobine dénaturée qu'elle contient. Il se peut que cette valeur soit fictive, mais elle désigne en toute rigueur un spectre d'absorption.

B . Solubilité de la méthémoglobine en présence du salicylate de sodium

Comme je l'ai indiqué précédemment, je suppose pour l'exposé du travail expérimental qu'il n'existe qu'une seule forme spectrale (V) pour la méthémoglobine dénaturée, qu'il est donc possible de doser. Lorsque l'on traite des solutions de méthémoglobine humaine par le salicylate, certaines se troublent, d'autres restent limpides et celles qui se troublent ne sont pas les plus riches en méthémoglobine dénaturée.

J'ai étudié l'influence de la concentration en salicylate dans les conditions expérimentales suivantes : Après le mélange, l'hémoglo-

bine est une solution dans un tampon phosphate de sodium (0,16 M en acide phosphorique) à pH 6,9. Le milieu contient du chlorure de sodium en quantité telle que la force ionique est 0,80, quelle que soit la concentration en salicylate de sodium. La concentration finale en méthémoglobine totale est $4,20 \times 10^{-4}$ en atomes de fer par litre. On opère à + 20°C.

Au cours de son évolution, l'absorption de chaque mélange est mesurée pour $\lambda = 6.350 \text{ \AA}$ au spectrophotomètre Beckman. On peut ainsi noter sa teneur en méthémoglobine dénaturée (test du spectre) à l'instant qui précède l'apparition d'un trouble. Le trouble se manifeste par une augmentation très rapide et très considérable de la densité optique apparente. Dans les cas où aucun trouble n'apparaît, on note la concentration de méthémoglobine dénaturée restée dissoute à la fin de l'expérience.

Sur la figure 3, j'ai porté en abscisses, dans le sens positif, les concentrations en salicylate de sodium ; dans le sens négatif, les concentrations en chlorure de sodium, et en ordonnées les concentrations en méthémoglobine dénaturée observées. Chacune des courbes correspond à une préparation différente de méthémoglobine. La partie en trait plein correspond à des valeurs observées lorsque la méthémoglobine précipite. Dans ce cas, il s'agit de solubilité limite de la méthémoglobine dénaturée. Dans l'autre cas (trait pointillé), il s'agit d'une valeur inférieure à la solubilité limite.

On note dans la région où la limite de solubilité est atteinte, que la solubilité croît lorsque la concentration en chlorure de sodium décroît. Mais ces expériences ont été faites avec deux variables : les concentrations en salicylate et en chlorure de sodium. On sait que le

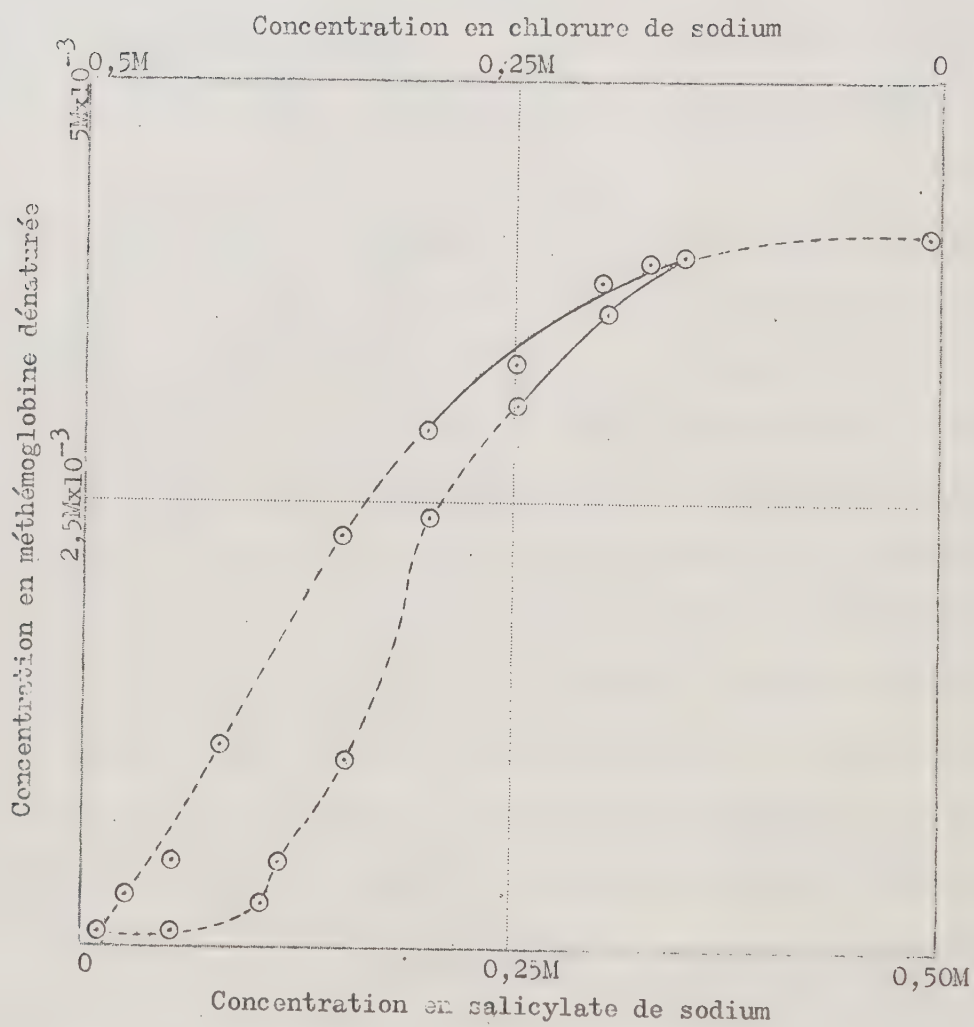


Figure 3.

Voir légende p. 21.

chlorure de sodium contribue à précipiter la méthémoglobine dénaturée. En effet, en son absence, on n'observe pas de trouble.

Pour déterminer si le salicylate de sodium est un solvant de la méthémoglobine dénaturée ou s'il a seulement un pouvoir précipitant moindre que celui du chlorure, on additionne d'eau distillée les diverses solutions de méthémoglobine de façon à doubler leur volume. Les substances précipitantes sont ainsi diluées de même que les substances solvantes. On observe que les précipités ne se redissolvent pas et que les solutions qui contenaient primitivement plus de 0,15 M en salicylate et qui étaient restées limpides se troublent instantanément et précipitent. La dilution du salicylate a provoqué la précipitation. Le salicylate se comporte comme un solvant de la méthémoglobine dénaturée.

On peut faire la contre-expérience en redissolvant la méthémoglobine fraîchement précipitée dans une solution de salicylate concentrée (une molécule par litre) tamponnée avec des phosphates mono- et disodiques.

J'ai essayé de déterminer, en fonction de la concentration du salicylate solvant, la quantité de méthémoglobine dénaturée qu'on peut y dissoudre. Pour cela on commence par préparer une solution de méthémoglobine dénaturée. On mélange la solution de méthémoglobine humaine à $4,6 \times 10^{-4}$ atome de fer par litre à un volume égal d'une solution de salicylate contenant une molécule par litre et tamponnée avec du phosphate de sodium (0,16 M en acide phosphorique). Le mélange contient par litre 0,5 molécule de salicylate et une quantité de méthémoglobine correspondant à 23×10^{-4} atome de fer totalement dénaturée (quant à son spectre d'absorption) et entièrement dissoute.

D'autre part, on prépare des solutions de salicylate dans un tampon

aux phosphates de sodium (0,16 M en acide phosphorique) à pH 7,1. Ces solutions contiennent du salicylate aux concentrations suivantes : 0 ; 0,05 ; 0,10 ; 0,15 ; 0,20 ; 0,25 ; 0,30 ; 0,35 M.

1 cm³ de la solution de méthémoglobine dénaturée préparée précédemment est mélangé à 10 cm³ du tampon phosphate de sodium ne contenant pas de salicylate. Le mélange contient alors 0,05 M de salicylate et $2,3 \times 10^{-4}$ atome de fer en méthémoglobine. Un précipité apparaît rapidement et le liquide clair ne révèle au spectrophotomètre que des traces de protéine. L'expérience est répétée en mélangeant 1 cm³ de la même solution de base de méthémoglobine dénaturée à 10 cm³ d'une des solutions tamponnées titrant 0,05 M, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35 M en salicylate de sodium (Tableau III, expérience A). Tous les mélanges précipitent ; seuls ceux dont le titre en salicylate est supérieur à 0,30 M contiennent une quantité appréciable de protéine dissoute.

Avant de tirer une conclusion des expériences précédentes sur le pouvoir dénaturant du salicylate, il nous a paru nécessaire de comparer la protéine dénaturée dans le salicylate à la concentration 0,5 M, à la protéine dénaturée dans des concentrations moindres de salicylate.

Le tableau III (B) indique les concentrations importantes en protéine dénaturée que l'on peut obtenir sans que la solution soit saturée, si l'on prépare la protéine dénaturée en mélangeant des solutions de salicylate avec une solution de protéine native c'est-à-dire sans jamais diminuer la concentration du salicylate en présence de la protéine.

On conclut de ce qui précède que les méthémoglobines préparées avec des solutions de salicylate à la concentration 0,5 M sont différentes des protéines dénaturées préparées dans des solutions moins riches en

TABLEAU III

Concentration du sâlcyate ajouté	Taux final du sâlcyate	Taux final de la méthémoglobine atome de fer p.lit. $\times 10^{-4}$	Observations	Protéine dissoute d'après l'absorption au début	Protéine dénaturée dissoute
Expériences A :					
0,00 M	0,05 M	2,3	précipité	traces	traces
0,05 M	0,10 M	"	"	"	"
0,10 M	0,14 M	"	"	"	"
0,15 M	0,185 M	"	"	"	"
0,20 M	0,23 M	"	"	"	"
0,25 M	0,275 M	"	"	"	"
0,30 M	0,33 M	"	"	$< 10^{-5}$	$< 10^{-5}$
0,35 M	0,365 M	"	"	$< 10^{-5}$	$< 10^{-5}$
Expériences B :					
0,00 M	0,00 M	4,6	reste limpide	$4,6 \times 10^{-4}$	0
0,11 M	0,10 M	"	"	"	1
0,165 M	0,15 M	"	"	"	1×10^{-4}
0,22 M	0,20 M	"	"	"	2×10^{-4}
0,275 M	0,25 M	"	"	"	$2,9 \times 10^{-4}$
0,33 M	0,30 M	"	"	"	$3,9 \times 10^{-4}$
0,385 M	0,35 M	"	"	"	$4,3 \times 10^{-4}$
0,44 M	0,40 M	"	"	"	$4,4 \times 10^{-4}$
0,495 M	0,45 M	"	"	"	$4,5 \times 10^{-4}$
0,55 M	0,50 M	"	"	"	$4,6 \times 10^{-4}$

salicylate. Les unes, en effet, précipitent en presque totalité dans les milieux où les autres restent bien solubles. Il suffit pour obtenir un trouble d'ajouter de l'eau (ou du tampon) dans une solution de méthémoglobine dénaturée, quelle que soit la concentration du salicylate qui a servi à la préparer. On peut même obtenir la précipitation en mélangeant deux solutions limpides de méthémoglobine dont la concentration en salicylate diffère de plus de 0,1 molécule par litre.

Il y a plusieurs méthémoglobines dénaturées par le salicylate.

Leur nature dépend de la concentration de la solution qui a servi à la préparation. Le salicylate plus concentré dissout les hémoglobines dénaturées dans des concentrations inférieures mais il les rend insolubles dans les solutions de salicylate dont la concentration est inférieure à la sienne.

Précipités de méthémoglobine dénaturée : J'ai obtenu plusieurs sortes de "précipités" de méthémoglobine humaine dénaturée par le salicylate. Tous sont insolubles dans l'eau. S'ils se sont formés à une température inférieure à 30°C, beaucoup sont solubles dans certaines solutions de salicylate, comme on l'a dit plus haut. D'autres sont insolubles dans le salicylate, même si la concentration de ce sel atteint une molécule par litre. Ce sont les produits insolubles de l'action du salicylate sur la méthémoglobine lorsque la température dépasse 30°C. Les précipités qui se produisent en milieu neutre ou alcalin se présentent, au microscope, comme de fines membranes plus ou moins plissées et roulées.

La protéine dénaturée, qui se sépare en milieu légèrement acide, adhère au verre sous forme de gouttelettes rouges. J'ai pu observer cette formation de gouttelettes dans les conditions suivantes :

On prend une solution aqueuse de méthémoglobine. Elle contient 50×10^{-4} atomes de fer par litre et 0,1 molécule gramme de chlorure de sodium. On la mélange, à volume égal avec une solution de salicylate de sodium, à une demi-molécule gramme par litre. Le pH du milieu non tamponné est 5,5, la température + 20°C. On met une goutte du mélange entre lame et lamelle, et on l'observe au microscope. Très vite apparaissent de petits granules agités de mouvement brownien; puis les grains grossissent, ils se montrent sphériques. Bientôt on voit des sphères de plus en plus grosses. Enfin, des gouttelettes rosées se fixent au verre. Ainsi la méthémoglobine dénaturée par le salicylate en milieu acide donne des coacervats.

C . Action du salicylate sur le spectre de la méthémoglobine en fonction du temps

Comme au paragraphe précédent, je considère seulement les deux formes spectrales I et V, à l'exclusion des formes intermédiaires. Par définition on appellera natives les molécules de méthémoglobine présentant le spectre I, dénaturées les molécules présentant le spectre V.

D'après ce qui a été dit plus haut (p.19) il suffit de mesurer l'absorption pour une seule longueur d'onde, la plus favorable 6.350 Å, pour déterminer le pourcentage de méthémoglobine restée native. J'ai étudié, en fonction du temps, la transformation de la méthémoglobine native en méthémoglobine dénaturée pour différentes concentrations de salicylate à la température de + 20°C pour une concentration de méthémoglobine de $4,6 \times 10^{-4}$ atome de fer par litre à pH 7,1 (tampon aux phosphates de sodium contenant 0,16 molécule d'acide phosphorique par litre. La force

ionique est différente pour chacun des essais parce que les additions de chlorure de sodium qui permettraient de la maintenir constante seraient une cause de précipitations.

Sur la figure 4, j'ai porté en abscisses les temps en minute, en ordonnées le pourcentage de méthémoglobine native (test du spectre). La concentration du salicylate est différente pour chacun des essais et sa concentration est indiquée près de chaque courbe. Une partie de la forme spectrale native disparaît très rapidement. Une autre partie disparaît plus lentement et l'évolution devient pratiquement insensible avant la 25^{ème} minute. La disparition lente de la fraction native obéit à une loi simple : par unité de temps il disparaît un certain pourcentage constant de la quantité qui reste à détruire avant que la réaction s'arrête pratiquement.

Si on appelle (N_f) la quantité de forme native restant à l'équilibre et (N_t) la quantité restant à un temps t , mesurée à partir de l'instant du mélange, on vérifie expérimentalement la relation :

$$\log (N_t - N_f) = - kt$$

Ceci est compatible avec l'existence d'une réaction limitée par un équilibre. On doit comparer l'évolution de la méthémoglobine en présence de salicylate à son évolution en milieu acide (18).

Si dans le cas du salicylate on porte en abscisses le temps, en ordonnées $\log(N_t - N_f)$ on obtient une droite (figure 5). Il est possible en prolongeant cette droite jusqu'à l'abscisse 0 de déterminer le logarithme de $(N_{t_0} - N_f)$. On connaît ainsi la quantité totale de forme native détruite au cours de la réaction lente.

La somme N_{t_0} de la quantité de méthémoglobine native qui a réagi

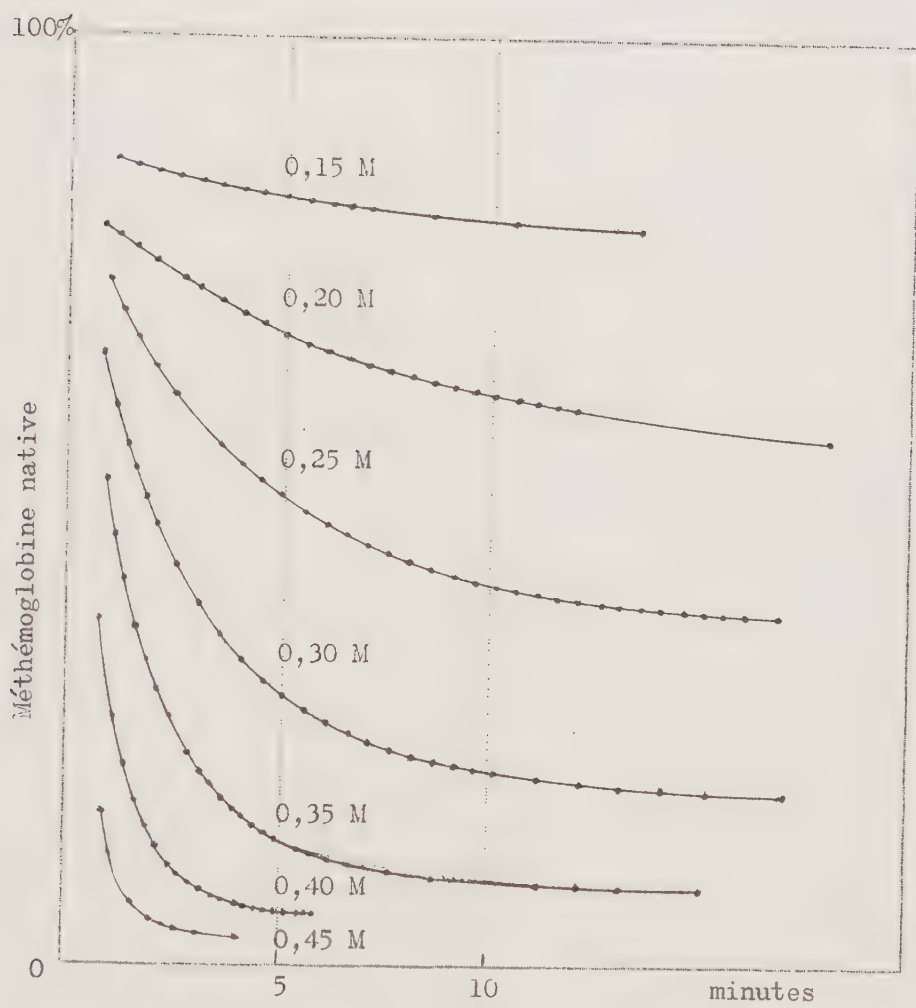


Figure 4.

Voir légende p. 28.



Y-axis label
X-axis label

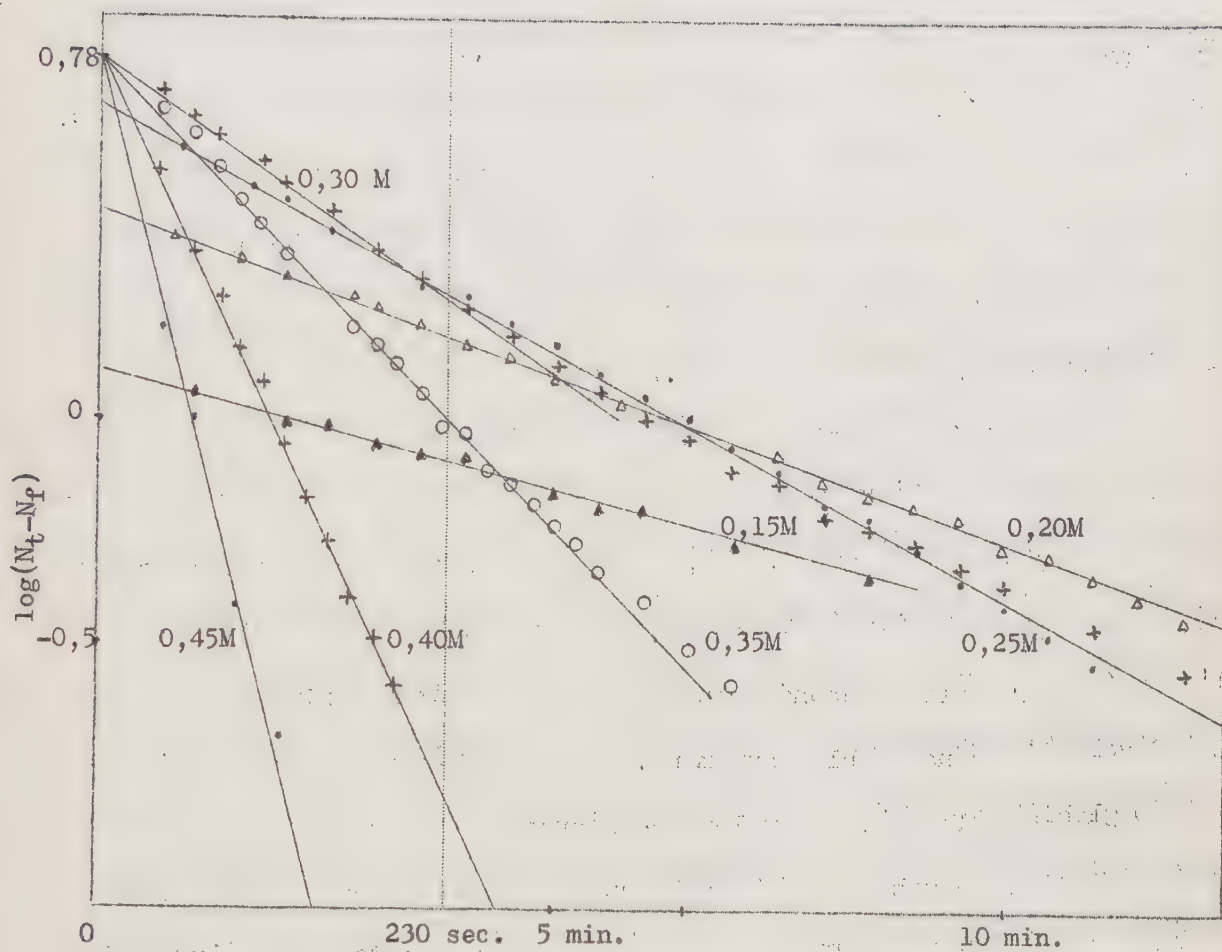


Figure 5.

Voir légende p. 28.

lentement et de celle qui reste à la fin de l'évolution présente avec la prise d'essai N une différence

$$N - [(N_{to} - N_f) + N_f] = N - N_{to}$$

La valeur non nulle de $N - N_{to}$ témoigne d'une évolution rapide pratiquement terminée avant la première mesure. Or, des travaux antérieurs (5, 6, 13, 16) ont établi la pluralité des hémoglobines humaines. On peut faire l'hypothèse suivante : La phase lente de l'évolution est la réaction du salicylate sur une méthémoglobine qui se dénature lentement ; une autre méthémoglobine parvient à un équilibre avec le salicylate quelques instants après le mélange.

La quantité $(N_{to} - N_f)$ de méthémoglobine native transformée pendant la phase lente de l'évolution est maxima lorsque la concentration du salicylate atteint ou dépasse 0,30 M. Le nombre exprimant cette valeur maxima de $(N_{to} - N_f)$ a été porté en ordonnée sur la courbe I de la figure 6 pour l'abscisse 0. Cette ordonnée représente la quantité maxima observée de méthémoglobine dénaturable lentement. Elle représente la totalité de la méthémoglobine "lente". La valeur de l'ordonnée de chacun des autres points de cette courbe représente la quantité de méthémoglobine lente restant à l'équilibre. Elle a été obtenue en retranchant de l'ordonnée du point dont l'abscisse est 0 la valeur de $(N_t - N_f)$ exprimant la quantité de méthémoglobine native transformée lentement par le salicylate à la concentration indiquée par l'abscisse.

La courbe III a pour ordonnées les valeurs de N_f . Elles représentent les quantités de méthémoglobine native mesurées à la fin de l'évolution. En retranchant les ordonnées de la courbe I de celles de la courbe III, on obtient celles de la courbe II. Elles représentent la

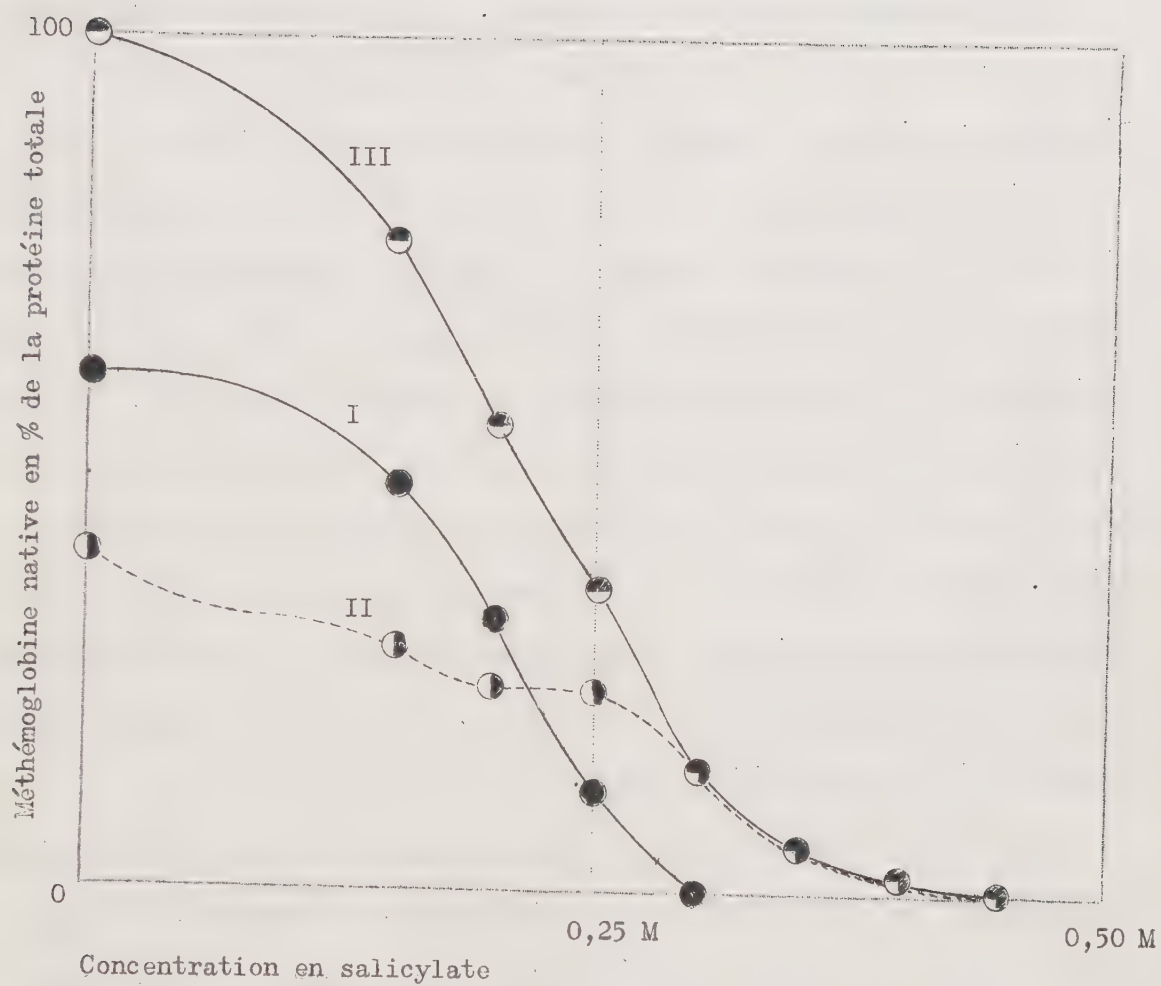


Figure 6.

Voir légende p. 30.

méthémoglobine rapide restée native à l'équilibre.

En comparant les courbes I et II, on remarque que la méthémoglobine rapide résiste mieux que la méthémoglobine lente à des concentrations relativement élevées de dénaturant. On peut donner un autre argument en faveur de l'hétérogénéité de la méthémoglobine : le taux de l'hémoglobine "rapide" augmente lorsque la solution vieillit à + 4°C.

J'ai "dénaturé" des fractions d'un même échantillon de méthémoglobine par le salicylate de sodium. J'ai répété l'expérience trois jours plus tard sur le même échantillon vieilli, dans les mêmes conditions expérimentales : le pH était 6,9 (tampon au phosphate de sodium). La concentration en acide phosphorique était de 0,16 molécule par litre. La force ionique est ajustée à la valeur 0,80 par addition de chlorure de sodium. Sur la figure 7, les concentrations en salicylate sont portées en abscisse, les quantités de méthémoglobine à réaction rapide dénaturées (test du spectre) sont portées en ordonnée. Elles sont exprimées en pourcentage de la méthémoglobine totale.

La courbe I se rapporte à un échantillon de méthémoglobine fraîchement préparée par oxydation de l'oxyhémoglobine. La courbe II correspond au même échantillon de méthémoglobine, mais conservé trois jours à + 4°C.

A partir de l'étude des solutions de méthémoglobine et de salicylate en équilibre, on peut essayer de préciser le mécanisme de fixation du salicylate.

La molécule de méthémoglobine est dénaturée lorsqu'elle a fixé un certain nombre n' de molécules de salicylate suivant le schéma :



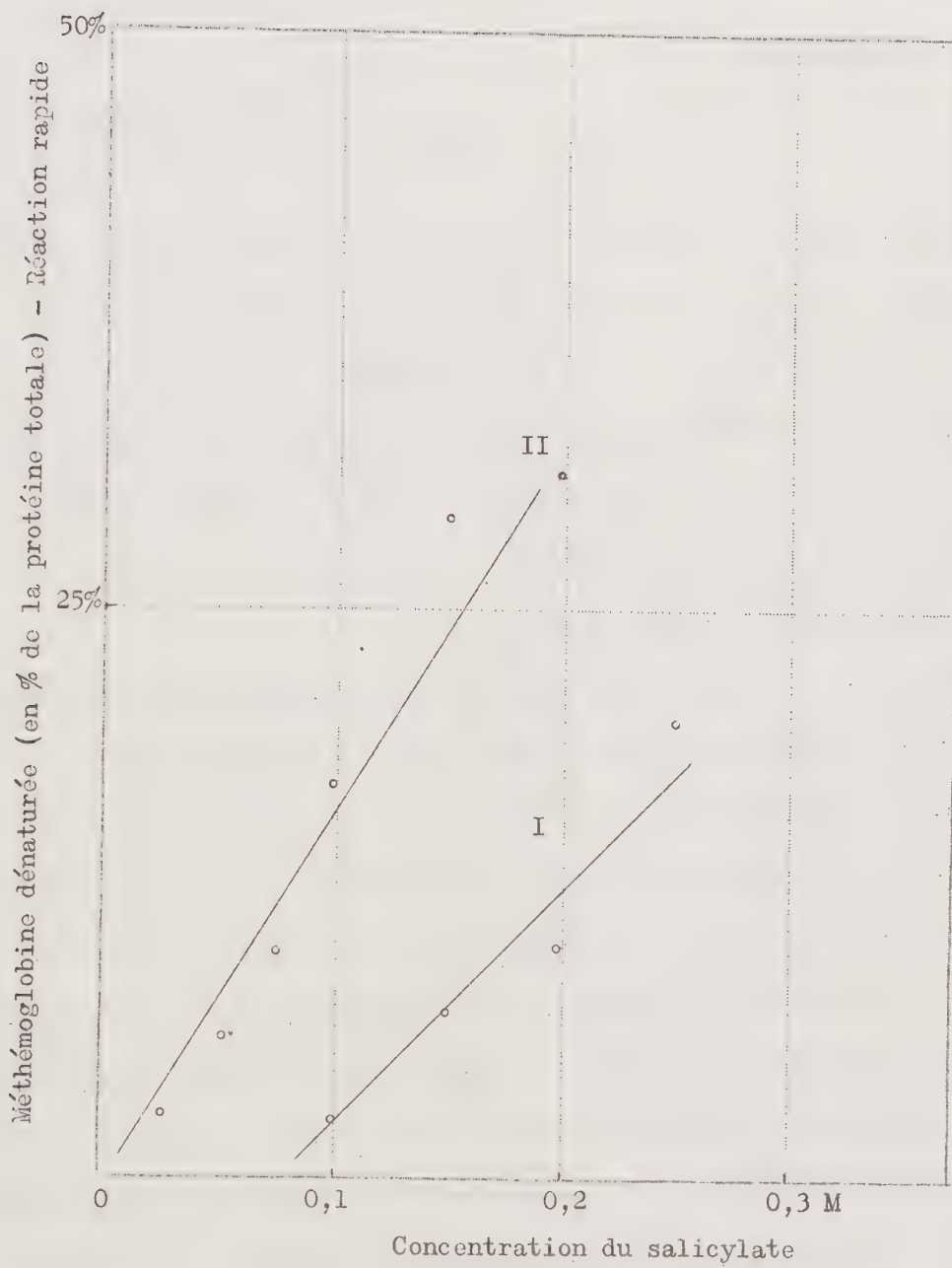


Figure 7.

Légende: voir p. 32.

On a l'équilibre :

$$\frac{(\text{MHb native}) \times [\text{Sal}]^{n'}}{(\text{MHb dénaturée})} = K$$

d'où l'on peut tirer

$$n' \log [\text{Sal}] = \log K + \log \frac{(\text{MHb dénaturée})}{(\text{MHb native})} \quad (1)$$

Si l'on porte en abscisse $\log [\text{Sal}]$ (déterminé à partir de la concentration en calculant le coefficient d'activité par la formule approchée $-\log y = 0,5 Z^2 \sqrt{\mu}$) et en ordonnée $\log (\text{MHb dénaturée})/(\text{MHb native})$ à l'équilibre, on constate qu'on obtient une droite (figure 8) aussi bien pour la forme lente (courbe I) que pour la forme rapide (courbe II). La pente dans un cas est de l'ordre de 6 et dans l'autre, supérieure à 7.

Puisqu'il faut plus d'une molécule de salicylate pour dénaturer une molécule de méthémoglobine, on peut faire deux hypothèses :
 1° ou bien la concentration en méthémoglobine mesurée d'après le test du spectre est la concentration en méthémoglobine n'ayant pas fixé de salicylate du tout, et cette méthémoglobine se dénature par fixation de 6 molécules de salicylate pratiquement d'un seul coup; 2° ou bien les molécules ayant fixé par exemple 5 molécules de salicylate présentent encore le spectre de la méthémoglobine native, alors que celles qui en ont fixé une de plus présentent le spectre de la méthémoglobine dénaturée. Dans le premier cas, le calcul de n' est correct, mais il reste à préciser le mécanisme de fixation quasi simultané des 6 molécules de salicylate. Si la fixation du salicylate est progressive, on se trouve dans le deuxième cas, mais la formule (1) n'est plus utilisable parce

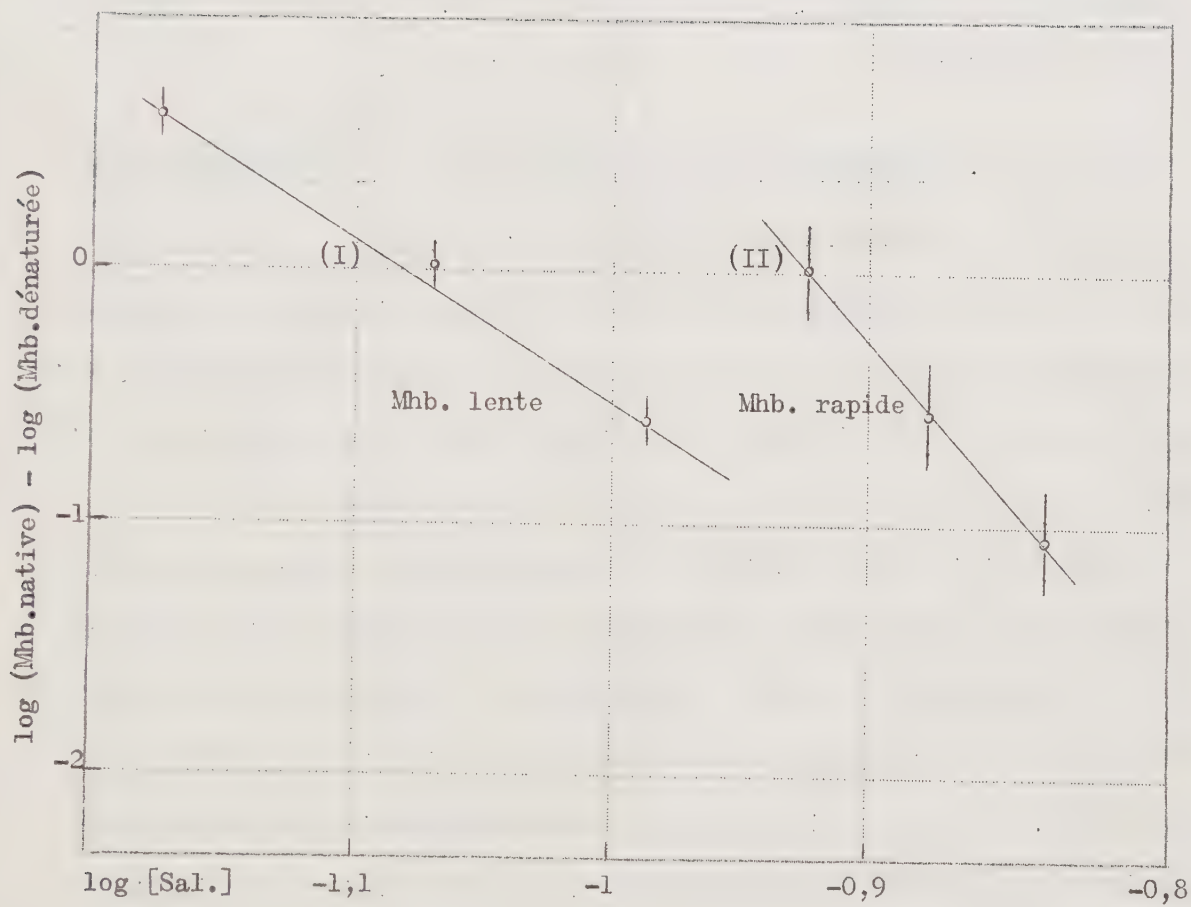


Figure 8.

Voir légende p. 34.

qu'elle suppose implicitement que la méthémoglobine native est la méthémoglobine qui n'a fixé aucune molécule de salicylate, alors que l'expérience ne permet d'atteindre que celle qui en fixe moins de n'.

On a pu constater que la méthémoglobine humaine initiale était hétérogène. D'autre part, lorsque le spectre révèle la dénaturation, il y a fixation de plusieurs molécules de salicylate. Il ne nous a pas été possible de préciser le mécanisme de cette fixation.

D . Réversibilité de la dénaturation de la méthémoglobine par dilution du salicylate.

La méthémoglobine dénaturée dans le salicylate est considérée par Anson comme le type de la protéine dénaturée réversiblement. Mais dans le cas de la méthémoglobine humaine, le phénomène ne paraît pas simple.

J'ai utilisé des solutions de méthémoglobine à une concentration de l'ordre de 10^{-4} atome de fer par litre, parce que les solutions plus diluées se dénaturent très vite, spontanément, et comme nous l'avons vu plus haut, les solutions plus concentrées précipitent par dilution du salicylate. Ceci rend difficile une étude quantitative des phénomènes consécutifs à la dilution du dénaturant. Cependant, j'ai pu vérifier qualitativement qu'il existe et j'ai pu en suivre l'évolution sur des solutions limpides (ou à peu près limpides).

Pour conserver des solutions à peu près limpides, il faut modifier très peu la concentration en salicylate. Par exemple, on prépare deux solutions de méthémoglobine qui ne diffèrent que faiblement par leur concentration en salicylate ou les laisse évoluer jusqu'à ce que le

spectre d'absorption reste stable. Pour la première la concentration du salicylate est 0,2 M, pour la seconde 0,3 M. On les mélange à des volumes égaux. Le liquide se trouble à peine. On peut faire des mesures au spectrophotomètre Beckman et suivre l'évolution de la réversion. Les résultats médiocres à cause du trouble, permettent néanmoins d'apprécier que la réversion est à peu près complète du point de vue spectral.

Conditions expérimentales -

La concentration de la méthémoglobine est $2,3 \times 10^{-4}$ atome de fer par litre. La concentration du tampon est 0,16 M en acide phosphorique, le pH est 7,1. On laisse évoluer 15 minutes deux solutions de méthémoglobine, l'une dans le tampon additionné de 0,2 molécule de salicylate de sodium par litre, et l'autre dans le tampon additionné de 0,3 molécule de salicylate de sodium par litre. On mélange ensuite à volumes égaux les deux solutions et on suit l'évolution de la densité optique pour 6.350 Å. La température de l'expérience est + 20°C. La cuve optique a une épaisseur de 1 cm.

Sur la figure 9, on a porté en abscisse le temps en minutes depuis le mélange des deux solutions de méthémoglobine, et en ordonnée le logarithme de la quantité de méthémoglobine qui reste à ramener au spectre natif avant d'atteindre l'équilibre. On a choisi pour exprimer la quantité de méthémoglobine une unité arbitraire telle que la quantité ($N_{to} - N_f$) soit égale à 100. L'évolution de la réversion ressemble à celle de la dénaturation bien que dans le milieu légèrement trouble, les mesures soient peu précises.

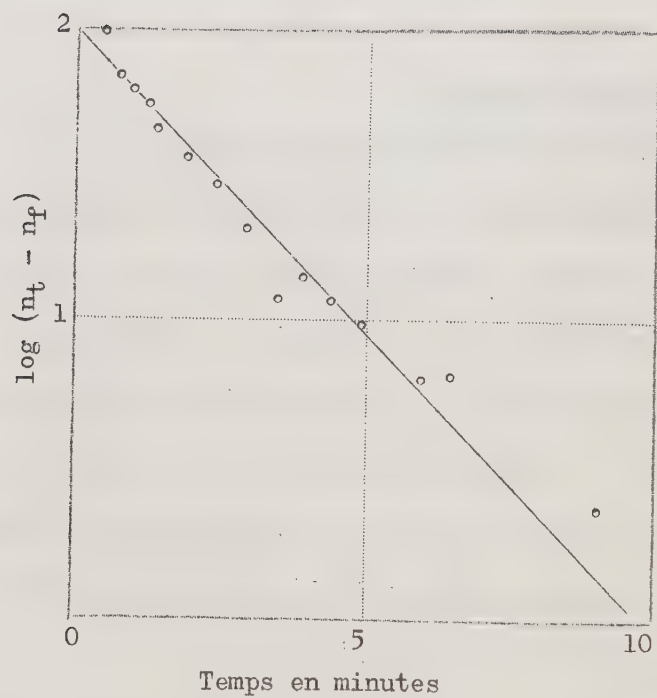


Figure 9.

Légende: voir p. 37.

E . Effets thermiques.

L'action de la chaleur au cours de la dénaturation par le salicylate se manifeste tout d'abord par l'apparition d'un précipité dans les solutions qui évoluent à une température supérieure à $+ 30^{\circ}\text{C}$, alors qu'à une température plus basse, $+ 20^{\circ}\text{C}$ par exemple, elles seraient restées limpides.

J'ai cherché si le spectre des solutions de méthémoglobine humaine dénaturées par le salicylate pouvait déceler une modification antérieure à la précipitation. J'ai pris des solutions de méthémoglobine dans des solutions de salicylate dont les concentrations étaient respectivement 0,2, 0,25, 0,3 M, et je les ai laissées évoluer à 20°C jusqu'à ce que le spectrophotomètre ne décèle plus de changement. A ces concentrations et à cette température, il n'y a pas de précipitation. Les solutions ont été ensuite portées à 30°C dans la cuve du spectrophotomètre même. L'appareil ne permet de déceler aucun changement jusqu'au moment où un trouble entraîne une montée très rapide de l'absorption apparente. Le trouble apparaît très brusquement et est suivi d'une précipitation rapide.

On peut faire l'hypothèse qu'une forme dénaturée peu soluble qui est en équilibre avec d'autres formes de la solution précipite au-dessus de $+ 30^{\circ}\text{C}$, parce que le déplacement de l'équilibre amène la saturation. Il n'en est rien car le refroidissement de la méthémoglobine n'inverse pas la réaction et le trouble subsiste. La réaction est irréversible. Il ne s'agit pas non plus d'une réaction relativement lente qui se manifesterait brusquement avec un retard à la précipitation. En effet, si l'on plonge dans l'eau glacée la cuve du spectrophotomètre au moment

où apparaît un trouble léger, la solution reste dans le même état pendant plusieurs heures.

A 30°C et aux températures plus élevées, la méthémoglobine humaine, en présence de salicylate, se transforme en une forme dénaturée très insoluble et irréversible. L'énergie d'activation de la réaction est certainement grande puisque la vitesse de réaction croît beaucoup pour une faible variation de température. La précipitation est toujours précoce lorsque la température atteint 33° ou 35°C mais pour quelques échantillons de protéine, elle n'apparaît à 30°C qu'après un temps suffisant pour qu'on puisse suivre l'évolution du spectre d'absorption pratiquement jusqu'à son terme.

Conditions expérimentales :

Le milieu est un tampon au phosphate de sodium contenant 0,16 molécule d'acide phosphorique par litre ; son pH est 7,2. La concentration de la méthémoglobine est $3,8 \times 10^{-4}$. Le milieu contient en outre des quantités variables de salicylate de sodium. Sur la figure 10, les concentrations du salicylate sont portées en abscisse, le pourcentage de méthémoglobine restée native à l'"équilibre" est porté en ordonnée. On constate qu'à 30°C (courbe I) la forme native d'après le spectre reste plus abondante qu'à 20°C (courbe II).

Réversibilité et changement de température.

J'ai essayé de déplacer l'"équilibre" en portant à 30°C les solutions ayant évolué pendant 25 minutes à 20°C. Mais aucune variation de la densité optique pour 6.350 Å n'a été observée. Une précipitation se produit après un temps variable suivant les échantillons. J'ai essayé aussi de déplacer l'"équilibre" obtenu à 30°C en refroidissant la solu-

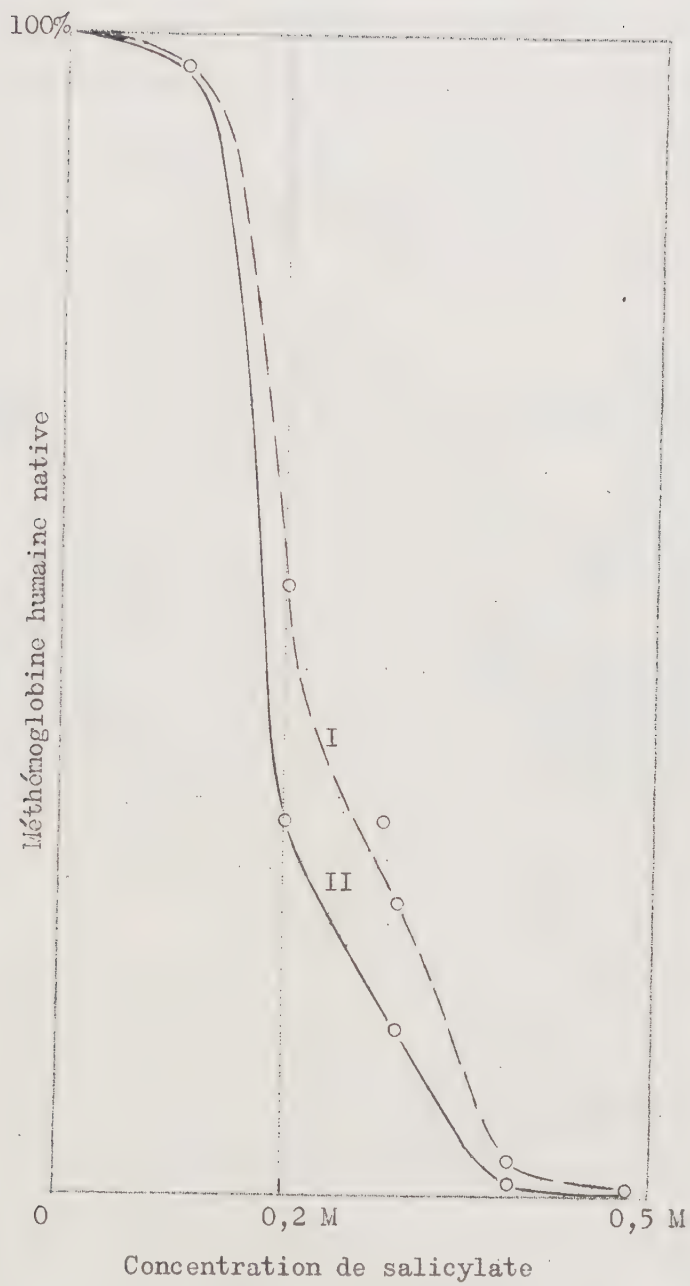


Figure 10.

Légende: voir p. 40.

tion à 20°C. Aucune variation de densité pour 6,350 Å n'a été observée.

Par contre, en plongeant dans la glace fondante un tube contenant de la méthémoglobine partiellement dénaturée, la concentration en salicylate étant 0,2 M et 0,3 M, on obtient la disparition presque totale de la bande d'absorption dans le rouge qui caractérise la méthémoglobine native. Ce phénomène est facilement observable au spectroscope. Il est très rapide et particulièrement net pour la concentration en salicylate 0,3 M, mais les solutions sont sursaturées à basse température et les sels cristallisent. Pour l'observer, il faut opérer avec de la verrerie mouillée. Même dans ces conditions, le succès d'un travail quantitatif est d'autant plus douteux que le retard à la précipitation excède rarement une minute. J'ai dû utiliser des concentrations en salicylate de 0,2 M. Les sels restent dissous à 4°C mais la variation de spectre est assez petite. Pour l'étudier, j'ai réalisé un montage de spectrophotographie. La méthode photographique impose :

1° Un éclairage bien uniforme de la fente d'entrée du spectrographe.

2° Des temps d'exposition suffisamment longs pour être facilement mesurés et reproduits avec une faible erreur relative. Le schéma de l'installation est donné par la figure 11.

On utilise comme source une petite ouverture rectangulaire S pratiquée dans un écran et éclairée bien uniformément par une lampe à filament condensé alimentée par une batterie d'accumulateurs. Un premier objectif photographique L_1 , placé de telle façon que la fente lumineuse S soit dans son plan focal, donne un faisceau sensiblement parallèle. La lampe est placée à une distance telle que l'image du filament F se fasse dans le plan de la cuve C. Il est en effet commode de n'avoir pas un faisceau trop large dans cette région. Un second objectif L_2 donne dans

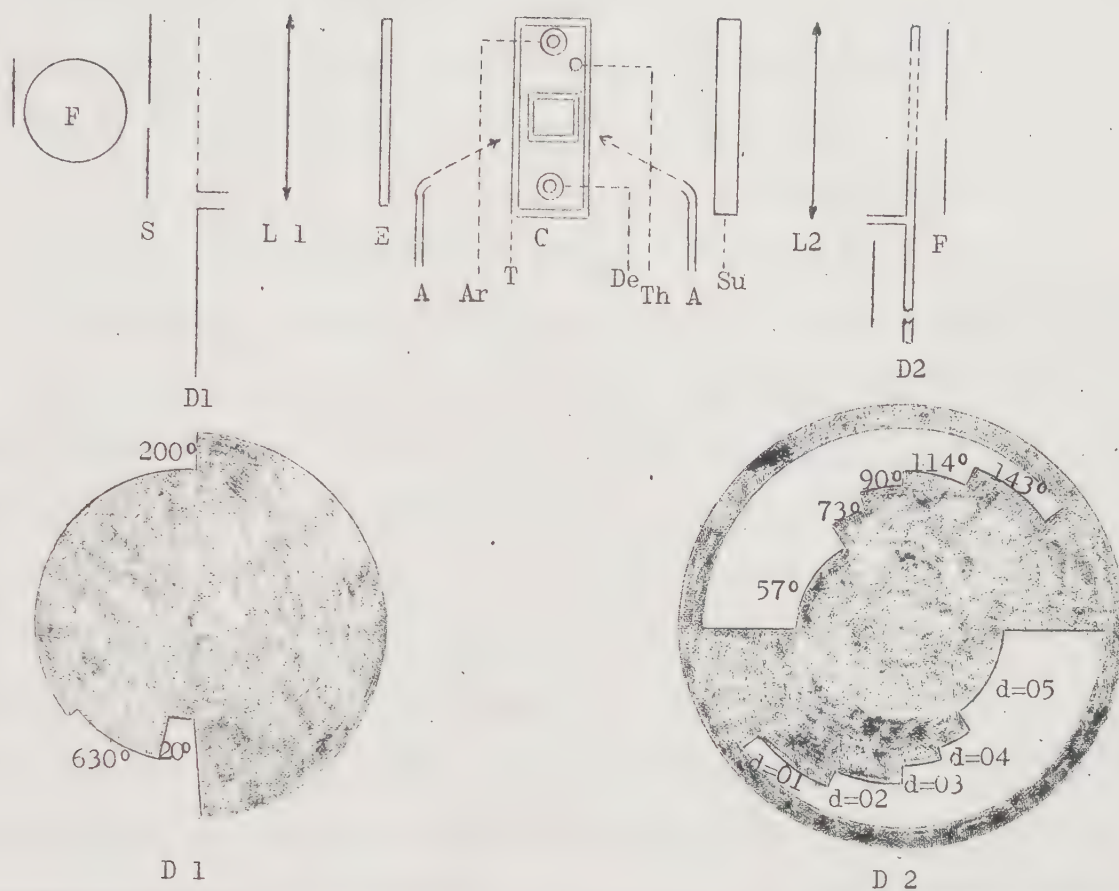


Figure 11.

Légende: voir pp. 42, 44 et 45.

son plan focal, une image de S sur la fente d'entrée du spectrographe.

Les temps d'exposition de la plaque sont commandés par la rotation d'un disque D_1 découpé en escalier. Ce disque est entraîné par un moteur synchrone à raison d'un tour à la minute. La distance de son axe au faisceau peut être modifiée, ce qui permet d'obtenir trois temps d'éclairement différents.

La cuve C qui contient la solution à étudier est posée dans une cuve optique en verre T ; de l'eau circule autour de C. Elle arrive par le tube Ar et est éliminée par le tube De. La cuve, lorsqu'elle est froide, tend à se recouvrir de buée. On y remédie en envoyant deux jets d'air sec au moyen des tubes A. L'air comprimé est filtré sur du coton. Néanmoins, il salit assez vite la cuve T. Il importe que les jets d'air rapides qui sortent des tubes A percutent obliquement la paroi de verre à une petite distance du faisceau lumineux. De cette façon, le verre est sali en dehors de la région de passage du faisceau lumineux et les nappes d'air sec entretenues par les jets maintiennent la cuve transparente dans la région utile.

Un disque D_2 sert à "hacher" la lumière. Pour l'étalonnage de l'émulsion de la plaque, on peut faire varier, dans un rapport connu, la quantité de lumière qu'elle reçoit en occultant le faisceau au moyen d'un secteur variable en rotation rapide.

D'une façon très rigoureuse, on ne peut pas admettre que les quantités de lumière qui provoquent le même noircissement sont égales si le temps d'exposition de la plaque n'a pas été le même dans les deux cas. Néanmoins, j'ai utilisé un secteur tournant pour repérer les densités et des temps de pose variables, car j'ai rencontré, au cours du travail,

des causes d'imprécision plus considérables.

Le secteur variable est constitué par un disque découpé représenté sur la figure. Il est entraîné par un moteur asynchrone à une vitesse voisine de 3.800 tours minute. L'axe de rotation peut occuper, par translation, cinq positions repérées. Leur utilisation permet d'obtenir les noircissements de la plaque correspondant à des densités de :
0,1 , 0,2 , 0,3 , 0,4 , 0,5.

Le montage comporte encore une surcharge amovible en verre "neutre" dont le spectre d'absorption a été déterminé et dont la densité optique est voisine de 1. Un écran coloré Wratten 78 Å permet d'atténuer les différences de tonalité de la plaque qui sont dues à la dispersion variable du spectrographe dans les diverses régions du spectre.

Régulation de la température. (Figure 12)

On utilise deux thermostats : l'un est chauffé par une résistance et agité par une hélice, sa température est réglée par un thermomètre à contact et un relais qui commande la résistance chauffante ; l'autre est refroidi par un groupe frigorifique ; un thermomètre à contact et un relais électromagnétique commandent le moteur du groupe.

La cuve qui contient le liquide à étudier est une cuve en verre à section carrée. Elle est maintenue en position repérée dans une autre cuve, elle aussi taillée optiquement, d'une capacité de 25 cm³ environ. Le liquide de l'un des thermostats s'écoule dans la cuve extérieure à une vitesse d'environ 20 cm³ par seconde. Pour éviter que la cuve en verre ne déborde, une trompe à eau aspire le trop-plein. L'eau et l'air aspirés en (1) parviennent dans l'ampoule (2). L'air se dirige vers la trompe à eau et l'eau sollicitée par la pesanteur retourne à

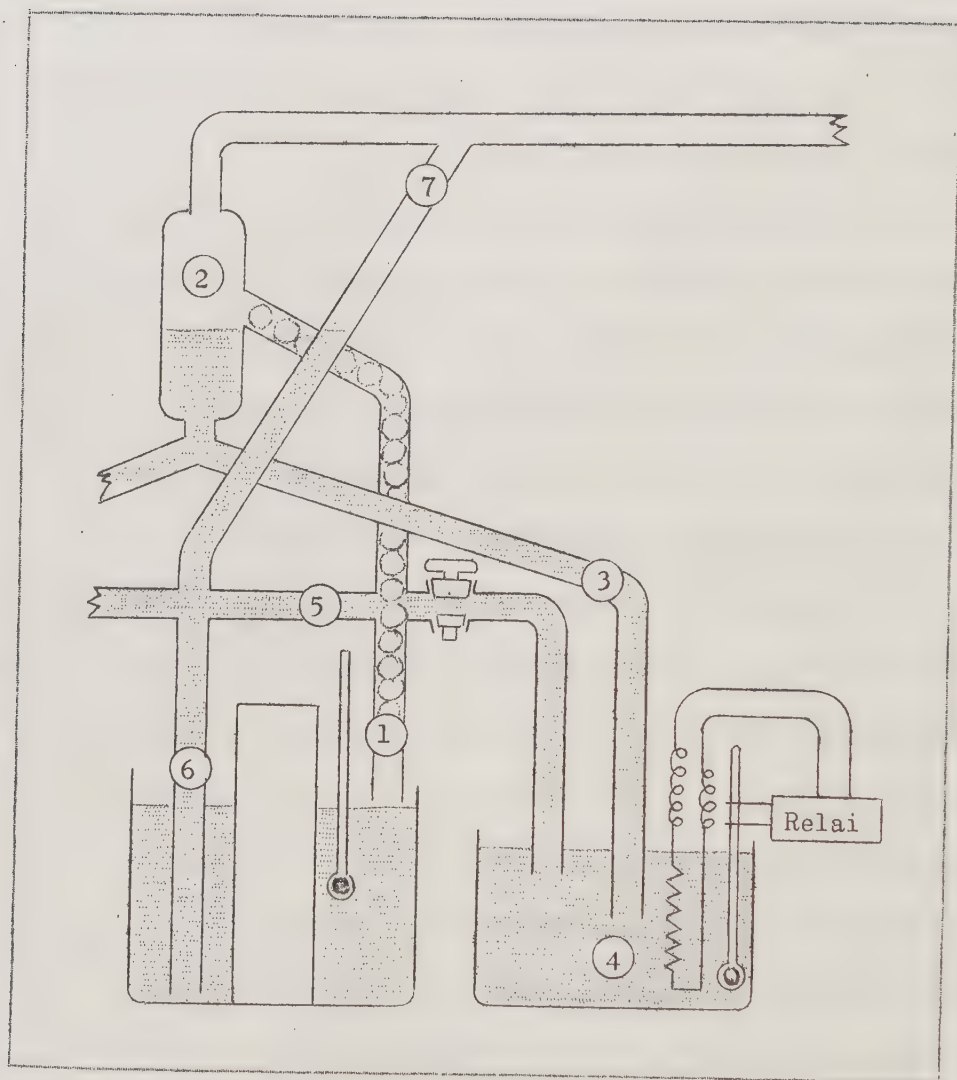


Figure 12.

Légende: voir pp. 45 et 47.

l'un ou l'autre des thermostats (3,4) suivant la température choisie.

L'eau du thermostat choisi est amenée dans la cuve T au moyen d'un siphon (5,6) qui se trouve amorcé au moyen du tube 7 dès que la trompe à eau entre en action. Un petit thermomètre donne la température exacte de la circulation qui peut être légèrement différente de celle du thermostat.

On a déterminé la courbe spectrale de solutions de méthémoglobine dénaturée à 20°C (figure 13, courbe II), à une concentration en salicylate 0,2 M. On a dû, à cause de la faible solubilité du salicylate à froid, utiliser seulement la concentration de 0,2 M en salicylate. Dans ces conditions, la modification de la courbe spectrale consécutive à la variation de température est assez faible. La courbe IV est relative à la même solution après refroidissement à 4°C. On porte à nouveau la solution à 20°C et on obtient la courbe III, qui ne coïncide pas avec la courbe initiale (II), bien que la température soit la même. En effet, la réaction ne revient que partiellement en arrière. Je n'ai jamais observé la réversion de plus de 70 % de la quantité dénaturée par refroidissement. D'autre part, la courbe spectrale des mélanges de salicylate et de méthémoglobine effectués à 4°C évolue avec une lenteur extrême.

La courbe I est relative à la méthémoglobine native. La courbe V correspond à une solution de méthémoglobine dans le salicylate 0,5 M à 20°C. Les courbes spectrales sont médiocres. En effet, les densités varient beaucoup avec les longueurs d'onde étudiées dans le rapport 1 à 10. Dans ces conditions, la lumière diffuse, non monochromatique, qui existe dans le spectrographe, entache les mesures d'erreurs considérables.

Il m'est pourtant permis de conclure qu'il existe, pour la dénatu-

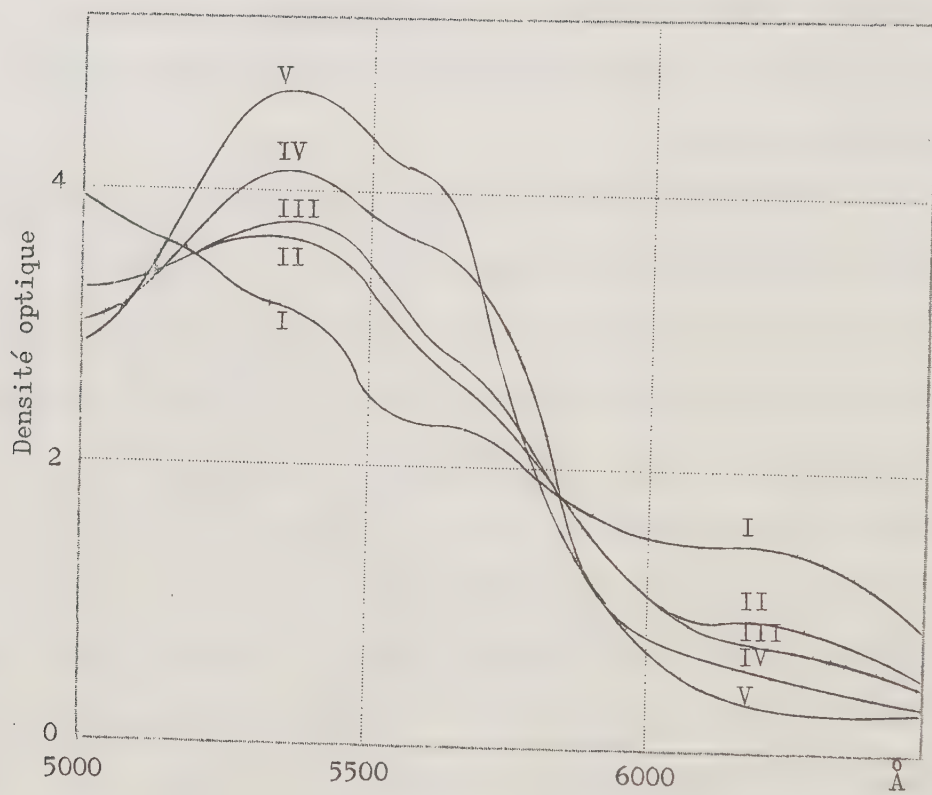


Figure 13.

ration de la méthémoglobine humaine par le salicylate un effet thermique. La dénaturation apparait exothermique et partiellement irréversible.

2° Action du dodécylsulfate de sodium sur la méthémoglobine humaine

Action du dodécylsulfate en présence d'eau et de chlorure de sodium -

Il est connu (2) que le dodécylsulfate de sodium précipite la méthémoglobine et qu'un excès de dodécylsulfate la redissout. J'ai essayé de préciser l'action de ce détergent. Afin de conserver à la protéine une solubilité suffisante pour son étude dans le liquide surnageant, on a ajouté très peu de sels.

Technique -

1 cm³ de la protéine dissoute dans le chlorure de sodium N/10 est ajouté à 9 cm³ d'eau contenant du dodécylsulfate. La concentration en méthémoglobine est de $6,1 \times 10^{-5}$ en fer, la concentration en chlorure de sodium, 1×10^{-2} . Les concentrations totales en dodécylsulfate (dodécylsulfate libre plus dodécylsulfate fixé) varient entre 0 et $2,5 \text{ M} \times 10^{-3}$; le pH est 6,8. Après mélange, les solutions sont centrifugées 15 minutes à 15.000 g au moyen du rotor préparatif d'une ultracentrifugeuse "Spinco", entre 21° et 22°C. Puis le liquide, qui tend à se troubler, est rapidement introduit dans une cuve de 1 cm d'épaisseur, du spectrophotomètre DU de Beckman, et les densités optiques sont déterminées pour les quatre longueurs d'onde : 6.350 Å (figure 14, courbe I), 6.150 Å (courbe II), 5.950 Å (courbe III), 5.800 Å (courbe IV). On a porté en abscisse les concentrations du dodécylsulfate (total) et en ordonnée les densités optiques.

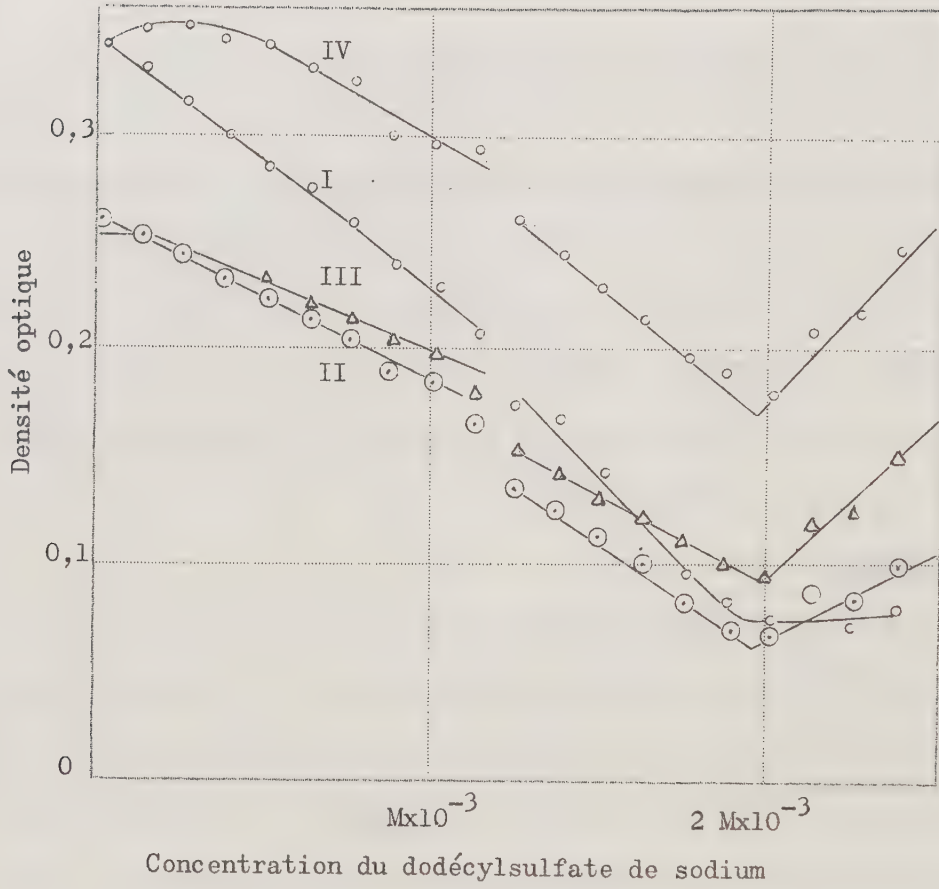


Figure 14.

Légende: voir p. 49.

Les mesures effectuées dans une cuve de 0,5 cm d'épaisseur, ont été commencées 20 minutes après le mélange de l'hémoglobine et du dodécylsulfate. Elles sont terminées environ 40 minutes après le mélange.

Les courbes sont discontinues car le domaine à explorer n'a pu être couvert qu'au moyen de deux séries de tubes qui ont été étudiés successivement, et le temps nécessaire à l'expérimentation empêche la fin d'une série de se raccorder exactement à la suivante.

J'ai choisi de faire les mesures pour les longueurs d'onde précises, pour les raisons suivantes : Pour la longueur d'onde $5.950 \text{ \AA}$, la densité optique de la méthémoglobine dénaturée par le dodécylsulfate est indépendante du pH (figure 15). Pour la longueur d'onde $6.150 \text{ \AA}$, la densité optique de la méthémoglobine native est indépendante du pH (figure 16). Fait plus intéressant, la densité optique de la méthémoglobine native est la même, à pH 6,8, pour les longueurs d'onde 5.800 et $6.350 \text{ \AA}$. On peut le constater sur la figure 16 et sur la figure 14, pour l'abscisse 0. La différence entre les abscisses des courbes IV et I de la figure 14 est donc proportionnelle à la quantité de méthémoglobine dénaturée dissoute. D'autre part, on peut calculer en s'aidant de la figure 15, quelle est la densité pour $6.350 \text{ \AA}$, de cette méthémoglobine dénaturée dissoute. La différence de cette valeur calculée à la valeur mesurée pour $6.350 \text{ \AA}$ représente la densité de la méthémoglobine native dissoute puisque les densités sont additives. La figure 16 permet d'établir le rapport entre le nombre qui exprime la densité pour $6.350 \text{ \AA}$ de la méthémoglobine native, et celui qui exprime sa concentration.

On peut ainsi constater que la concentration de la méthémoglobine

native dissoute qui était en absence de dodécylsulfate de $6,1 \times 10^{-5}$ M (en atomes de fer) diminue d'une quantité proportionnelle à la concentration du dodécylsulfate ajouté, jusqu'à ce que cette concentration atteigne 2×10^{-3} M. La concentration de la méthémoglobine dénaturée dissoute croît un peu moins rapidement que celle de la méthémoglobine native ne diminue, de telle sorte que pour la concentration 2×10^{-3} du dodécylsulfate, elle est seulement de 2×10^{-5} M. En contre partie, il se produit une précipitation de plus en plus abondante. Puis lorsque la concentration en dodécylsulfate dépasse 2×10^{-3} M, la concentration de méthémoglobine dénaturée dissoute croît rapidement, alors que la concentration de méthémoglobine native reste inchangée, comme si la totalité du dodécylsulfate servait à redissoudre le précipité.

3° Action du dodécylsulfate de sodium en présence d'urée

Solubilisation de la méthémoglobine dénaturée par le dodécylsulfate.

J'ai cherché un solvant capable de dissoudre, à des concentrations notables, la méthémoglobine dénaturée par le dodécylsulfate. Comme le salicylate, l'urée a la propriété de dissoudre les protéines dénaturées. J'ai employé une solution saline tamponnée contenant deux molécules gramme d'urée par litre. A cette concentration, l'urée maintient en solution les formes dénaturées par le dodécylsulfate, mais seule, elle n'a à peu près aucun pouvoir dénaturant, ainsi que je l'ai vérifié.

Solutions de dodécylsulfate de sodium en présence d'urée.

Le dodécylsulfate est bien soluble dans l'eau distillée aux températures supérieures à 30°C , mais très peu soluble dans les tampons que

j'ai utilisés et qui contiennent 0,16 molécule d'acide phosphorique par litre

Lorsqu'on introduit, dans un tel milieu, le dodécylsulfate dissous dans l'eau distillée à 30°C, une opalescence nette apparaît après quelques minutes si la concentration finale du dodécylsulfate dépasse 10^{-5} molécules par litre. Ainsi la solution micellaire limpide qu'on avait obtenue dans l'eau à 30°C précipite lorsqu'on la dilue dans le tampon à 20°C.

On peut mettre en contact la méthémoglobine et le dodécylsulfate de deux manières différentes : soit en versant une petite quantité d'une solution concentrée de méthémoglobine dans un volume plus grand d'une suspension fine de dodécylsulfate ; soit en versant un petit volume d'une solution limpide et concentrée de dodécylsulfate sur la méthémoglobine préalablement diluée. L'évolution de la méthémoglobine dépend du mode de mélange qui a été choisi.

A - Mise en contact de la méthémoglobine et du dodécylsulfate en suspension fine.

a) - Quantité de dodécylsulfate fixée -

La suspension est obtenue en versant une solution à 30°C de dodécylsulfate à la concentration de 0,1 molécule par litre dans le tampon contenant l'urée. Après addition de méthémoglobine, la suspension de dodécylsulfate se clarifie en quelques secondes tandis que la méthémoglobine qui était brune, rougit. Comme une solution de dodécylsulfate n'est limpide que lorsque sa concentration, en l'absence de méthémoglo-

bine, est inférieure à 10^{-5} molécule par litre, on peut conclure que la méthémoglobine a fixé pratiquement tout le dodécylsulfate.

Les concentrations du dodécylsulfate total (fixé et libre) utilisées au cours des expériences, sont de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-2} molécule par litre. On connaît ainsi avec une très bonne approximation la quantité de dodécylsulfate fixée.

b) - Le spectre -

Il varie rapidement pendant les premières secondes, puis plus lentement. On peut suivre une variation très lente pendant plus de 24 heures, mais dans cette évolution lente, l'urée semble jouer un rôle important. On s'est donc borné à l'étude de la phase rapide. Pour des raisons de commodité, on a fait les mesures de densité au spectrophotomètre DU de Beckman au bout d'une minute.

On note d'abord que la transformation du spectre est constituée par le passage de la forme native à une seule forme dénaturée du point de vue spectral. En effet, les variations de densité optique pour diverses longueurs d'onde sont proportionnelles entre elles. J'ai établi, pour divers pH, les courbes d'absorption de la méthémoglobine humaine dénaturée par le salicylate dans les conditions suivantes : 5 mg de dodécylsulfate sont dissous dans 55 cm^3 d'eau ; on y ajoute 55 cm^3 d'une solution contenant 4 molécules grammes d'urée pour 1 litre d'eau, puis $0,5 \text{ cm}^3$ d'une solution de méthémoglobine contenant 6,5 millièmes de fer par litre.

D'autre part, on prépare une série de tubes contenant chacun $0,5 \text{ cm}^3$ de phosphate monosodique à 1 molécule d'acide phosphorique par litre, et on ajoute : dans le premier tube, $0,5 \text{ cm}^3$ d'une solution de

chlorure de sodium à la concentration de 1 molécule gramme par litre, dans le second $0,05 \text{ cm}^3$ d'une solution normale de soude et $0,45 \text{ cm}^3$ de la solution de chlorure de sodium, dans les suivants on augmente la quantité de solution de soude $0,05 \text{ cm}^3$ et on diminue d'autant celle de la solution de chlorure. Le taux final de la méthémoglobine est $2,78 \times 10^{-5}$ (atome de fer par litre), celui de l'urée est 2 molécules gramme. Le pH est mesuré pour chaque solution. La figure 15 donne le spectre d'absorption établi à partir des valeurs mesurées au spectrophotomètre. On a porté en abscisse les longueurs d'onde, en ordonnée les densités optiques pour 1 cm d'épaisseur. Les pH étaient les suivants : 6, courbe I ; 6,15, courbe II ; 6,35, courbe III ; 6,55, courbe IV ; 6,75, courbe V ; 7, courbe VI.

Dans des conditions analogues mais en l'absence de dodécylsulfate, j'ai établi les spectres d'absorption de la méthémoglobine à la concentration de 3×10^{-5} atome de fer par litre. Les pH étaient, pour les courbes de la figure 16 : 6,32, courbe I ; 7,23, courbe II ; 8,2, courbe III ; 8,6, courbe IV . Les figures 15 et 16 permettent de calculer le "taux de dénaturation" à divers pH à partir de mesures de densité optique.

c) - Variation de la quantité de méthémoglobine dénaturée (test du spectre) en fonction de la quantité de dodécylsulfate utilisée -

On verse 9 cm^3 de suspension de dodécylsulfate à diverses concentrations dans $0,5 \text{ cm}^3$ d'une solution de méthémoglobine. Les concentrations dans le milieu final sont pour la méthémoglobine $1,5 \times 10^{-4}$ en atome de fer ; pour l'acide phosphorique 0,095 M ; pour l'urée 1,8 M. Le pH est 6,5.

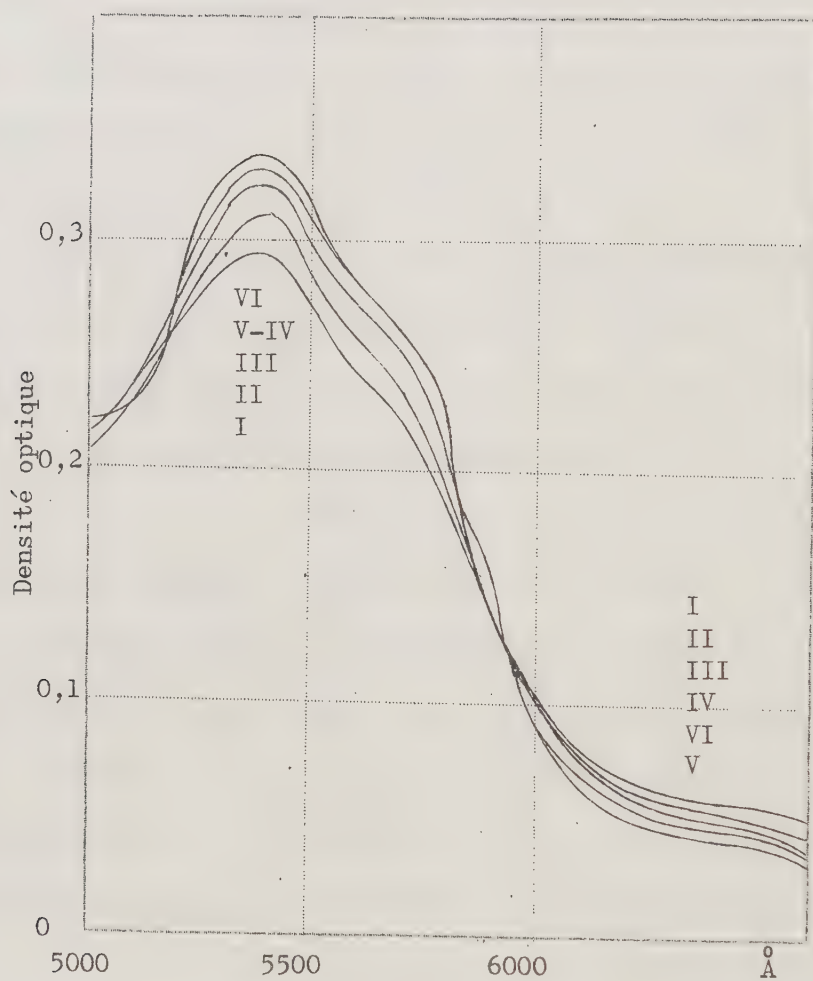


Figure 15.

Légende: voir p. 55.

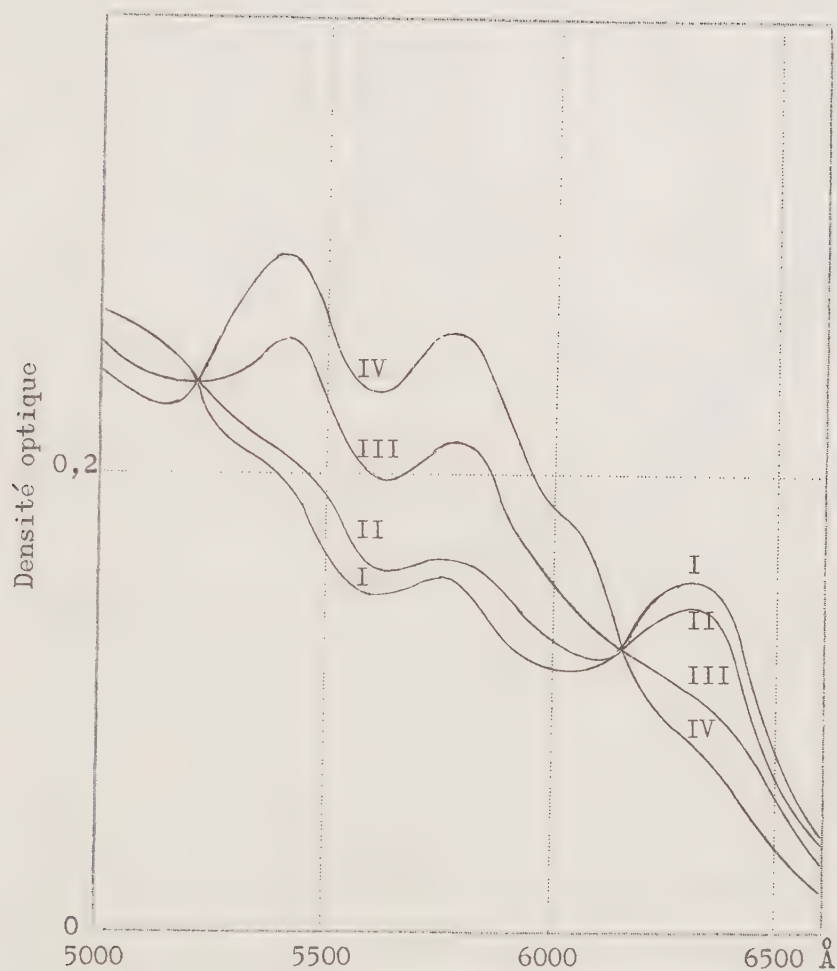


Figure 16.

Légende: voir p. 55.

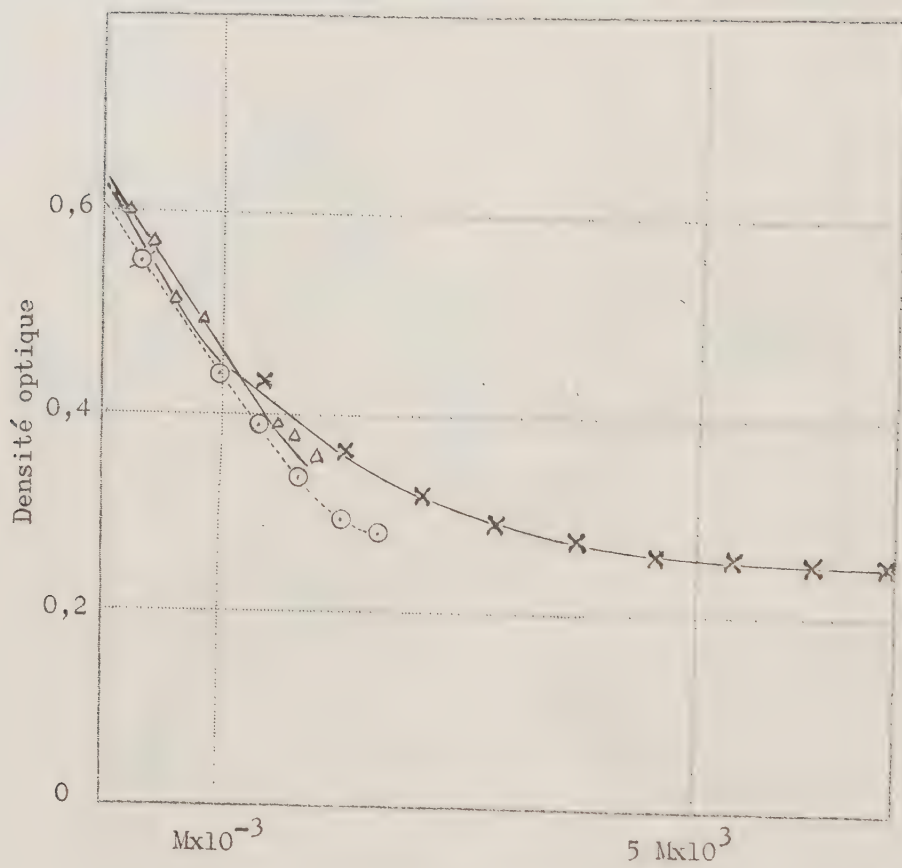


Figure 17.

Légende: voir p. 59.

Sur la figure 17, les concentrations totales en dodécylsulfate sont portées en abscisse et les densités optiques, après une minute et pour $6.350 \text{ \AA}$, en ordonnée. Sur les trois courbes qui correspondent chacune à un échantillon, on remarque que la quantité de protéine dénaturée en une minute est proportionnelle à la concentration totale du dodécylsulfate. Comme la solution est devenue claire, il ne reste que très peu de dodécylsulfate libre et l'on peut calculer la quantité fixée puisque la solution est devenue claire. Ce résultat suggère que dans ces conditions, il se forme un composé défini de méthémoglobine et de dodécylsulfate. :

Connaissant la densité optique correspondant à la dénaturation complète, on peut, en prolongeant la portion rectiligne des courbes, calculer qu'il faut 17 molécules de salicylate pour dénaturer la quantité de globine correspondant à un atome de fer. En effet, l'abscisse du point ayant pour ordonnée la densité correspondant à la dénaturation totale de la méthémoglobine présente, donne le nombre de molécules par litre de dodécylsulfate nécessaire pour obtenir ce résultat. Le rapport de ce nombre à celui des molécules de la protéine dissoute exprimerait le nombre de molécules de dodécylsulfate fixé par molécule de protéine puisque tout le dodécylsulfate est fixé. Pour éviter d'introduire une hypothèse sur le poids moléculaire de la protéine, on exprime sa concentration en atomes de fer par litre.

B - Mise en contact de la méthémoglobine et du dodécylsulfate en solution micellaire.

Les vitesses d'évolution des solutions de méthémoglobine humaine qui contiennent une suspension de dodécylsulfate sont sujettes à des variations. L'état de dispersion du détersif est bien difficilement reproductible. Pour éviter cet inconvénient, j'ai utilisé du dodécylsulfate dissous dans l'eau à 30°C. Cette solution micellaire ne précipite pas instantanément lorsqu'elle refroidit. On peut la mélanger avec une solution de méthémoglobine et d'urée dans un tampon. La sursaturation persiste plus longtemps qu'il n'est nécessaire pour que la protéine fixe le réactif. J'ai étudié la quantité de protéine dénaturée par le dodécylsulfate en fonction du temps, de la quantité de dodécylsulfate utilisée, de la température et de la concentration en protéine.

a) - Variation de la quantité de protéine dénaturée en fonction du temps pour quelques concentrations de dodécylsulfate -

On mélange dans un tube le tampon contenant de l'urée et la solution de méthémoglobine. On ajoute une petite quantité d'eau bidistillée. Cette quantité est variable, elle est destinée à compenser les différences de concentrations qui résulteraient des différences de volumes de la solution de dodécylsulfate qu'on ajoutera ensuite. En effet, on ajoute des volumes variables d'une même solution de dodécylsulfate. L'instant de l'addition est considéré comme le temps zéro de la réaction. Il est suivi de quelques secondes d'une agitation énergique.

Les figures 18 et 19 montrent l'évolution d'une solution aqueuse de méthémoglobine. On porte en ordonnée les densités optiques pour 6.150 Å ; en abscisse, les temps en minutes qui se sont écoulés depuis l'addition

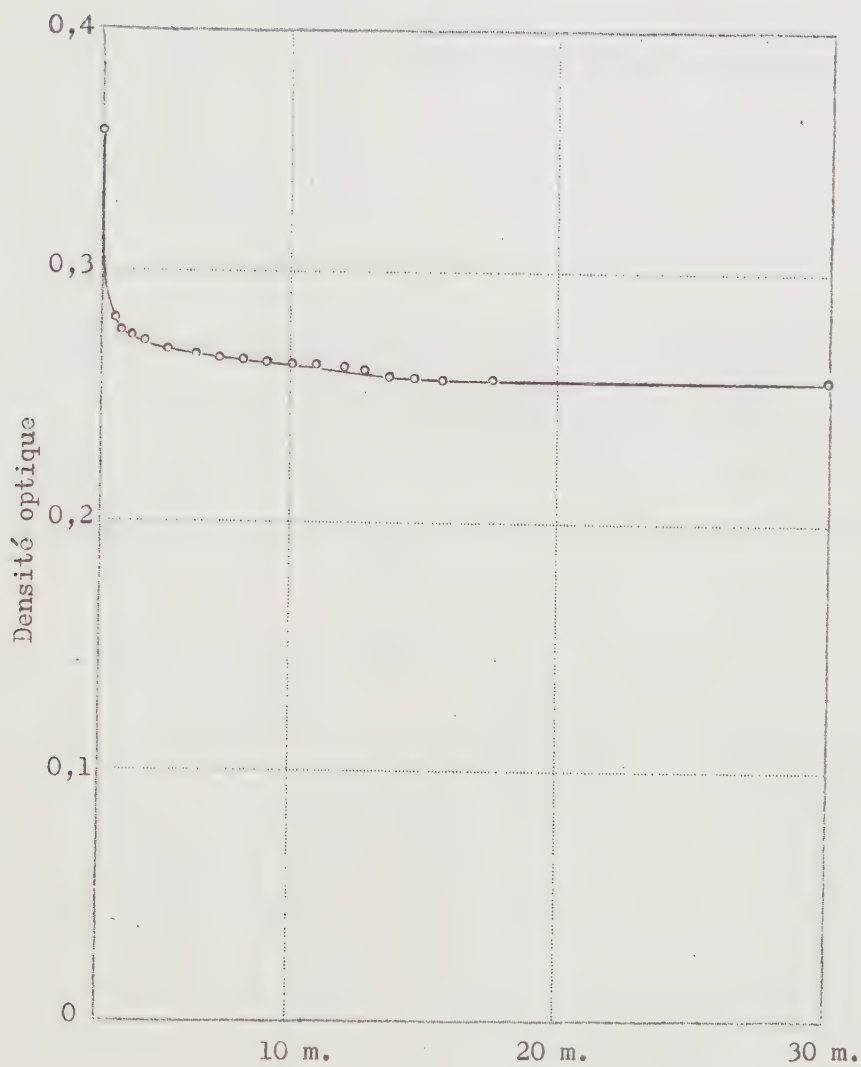


Figure 18.

Légende: voir pp. 60 et 62.

du dodécylsulfate. La densité optique pour le temps 0 est celle d'une solution qui ne contient pas de dodécylsulfate.

La concentration en acide phosphorique est 0,05 M et le pH 6,8. La concentration de l'urée est 2 M, celle de la méthémoglobine est $0,82 \times 10^{-4}$. La concentration du dodécylsulfate est $0,67 \times 10^{-3}$ M, pour la figure 18, et $1,25 \times 10^{-3}$ M, pour la figure 19. On remarque que les réactions présentent d'abord une phase rapide.

b) - Variation de la quantité de méthémoglobine dénaturée en fonction de la quantité de dodécylsulfate utilisée -

J'ai utilisé le même milieu que précédemment et la même concentration de méthémoglobine, en faisant varier les quantités de dodécylsulfate (figure 20).

Les densités optiques à 6.150 Å sont portées en ordonnée, les concentrations totales de dodécylsulfate sont portées en abscisse. Les mesures de densité ont été faites une minute après l'addition du dodécylsulfate pour la courbe I, 50 minutes pour la courbe II, 120 minutes pour la courbe III. L'augmentation de la densité optique qui paraît due à l'influence d'une faible dose de dodécylsulfate, est explicable par des erreurs de mesure de $\pm 1,5$ %. Le phénomène ne se retrouve pas à l'occasion d'autres expériences. On remarque qu'une très petite addition de dodécylsulfate ne modifie pas le spectre, soit que la réaction ait un seuil, soit que les impuretés de l'hémoglobine fixent très énergiquement le détersif. On note aussi que l'urée seule (pour la valeur 0 de la concentration en dodécylsulfate) dénature une quantité notable de méthémoglobine lorsque l'expérience se prolonge. La quantité de méthémoglobine dénaturée en une minute est proportionnelle à la quan-

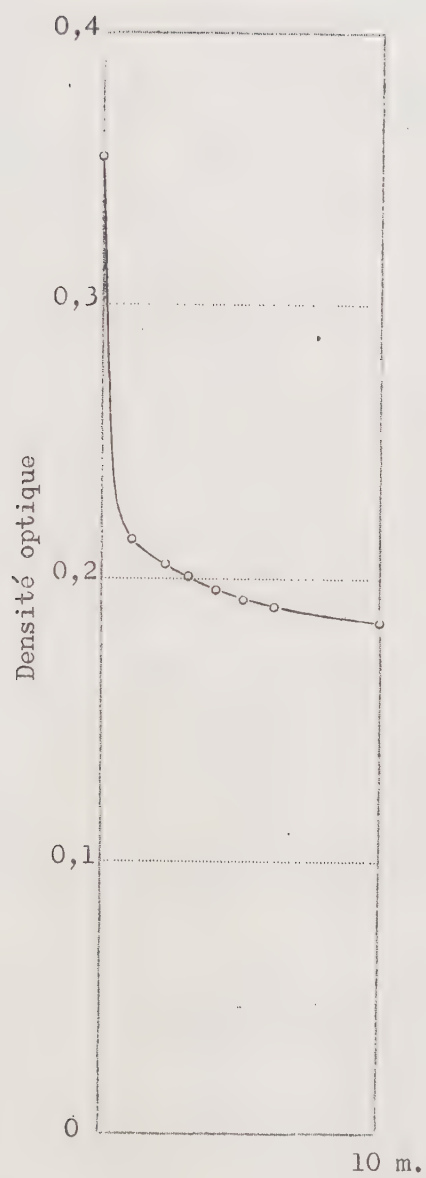


Figure 19.

Légende: voir pp. 60 et 62.

tité de dodécylsulfate ajoutée. On constate là aussi qu'il faut 17 molécules de dodécylsulfate pour dénaturer en une minute la quantité de méthémoglobine correspondant à un hème. D'autre part, on observe encore que les solutions se troublent d'autant plus vite que la quantité de dodécylsulfate employée est plus grande. C'est ce qui a empêché les mesures sur les échantillons les plus riches en dodécylsulfate à partir de la 50 ème minute. La quantité de méthémoglobine dénaturée (test du spectre) restée dissoute à la 1ère minute, est supérieure à celle qui est encore en solution à la 50 ème minute et même plus tard. On peut penser à un retard à la précipitation, mais il est aussi possible qu'une réaction transforme une première forme de méthémoglobine dénaturée en une autre forme moins soluble que la première. Il était donc intéressant de savoir si la réaction que décèle le spectre est la même dans la phase initiale rapide et dans la phase lente. Un procédé possible consiste à étudier l'influence de la température sur ces deux phases.

c) - Influence de la température

La principale difficulté consiste à éviter la précipitation. Dans ce but, j'ai travaillé dans les conditions suivantes : le tampon est à la concentration 0,25 M en phosphate, le pH est 7,8. La concentration de la méthémoglobine est $7,4 \times 10^{-5}$ M. Les expériences ont été faites à 18°C et 25°C ; les résultats sont représentés par les figures 21 et 22.

Les concentrations de dodécylsulfate sont portées en abscisse. En ordonnée sont portées les densités optiques pour 6.150 Å. Une minute après le mélange, les densités optiques sont les mêmes à 18°C et à 25°C

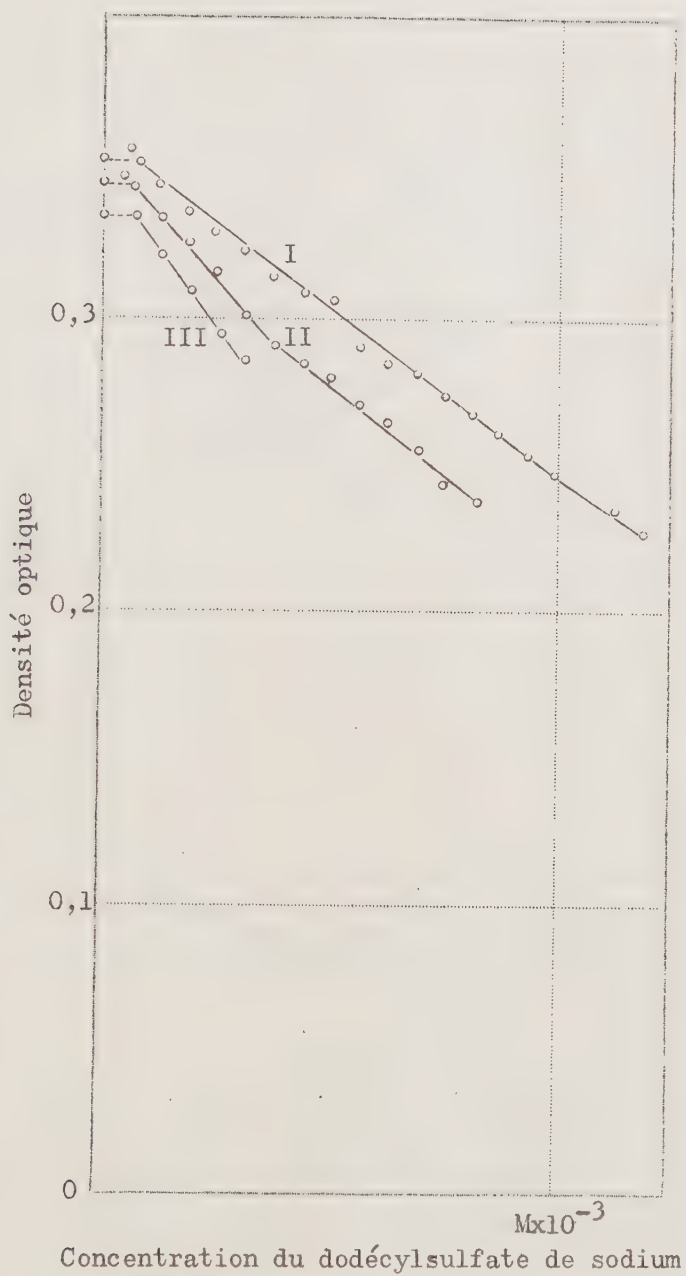


Figure 20.

Légende: voir p. 62.

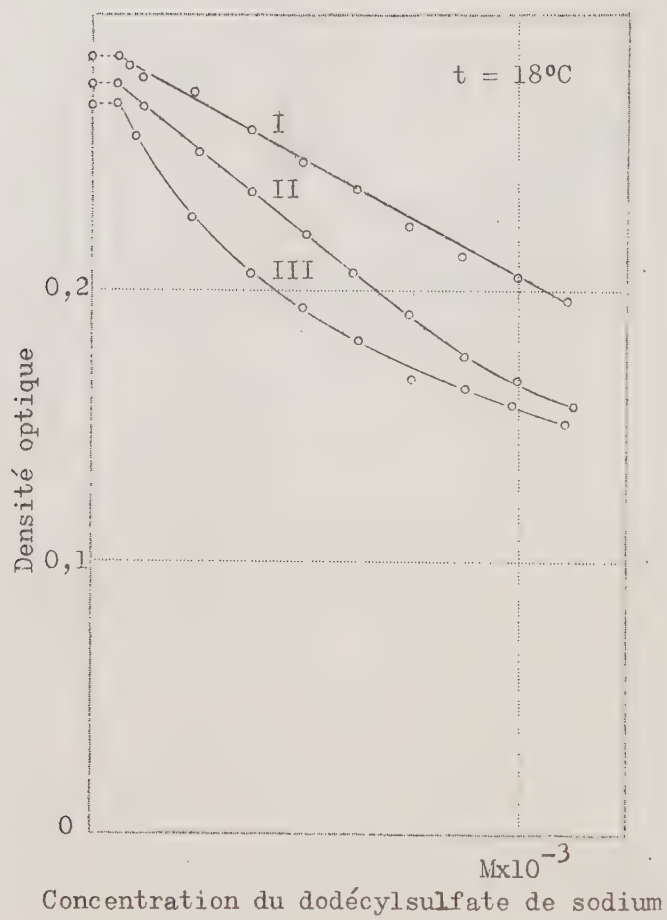


Figure 21.

Légende: voir pp. 64 et 65.

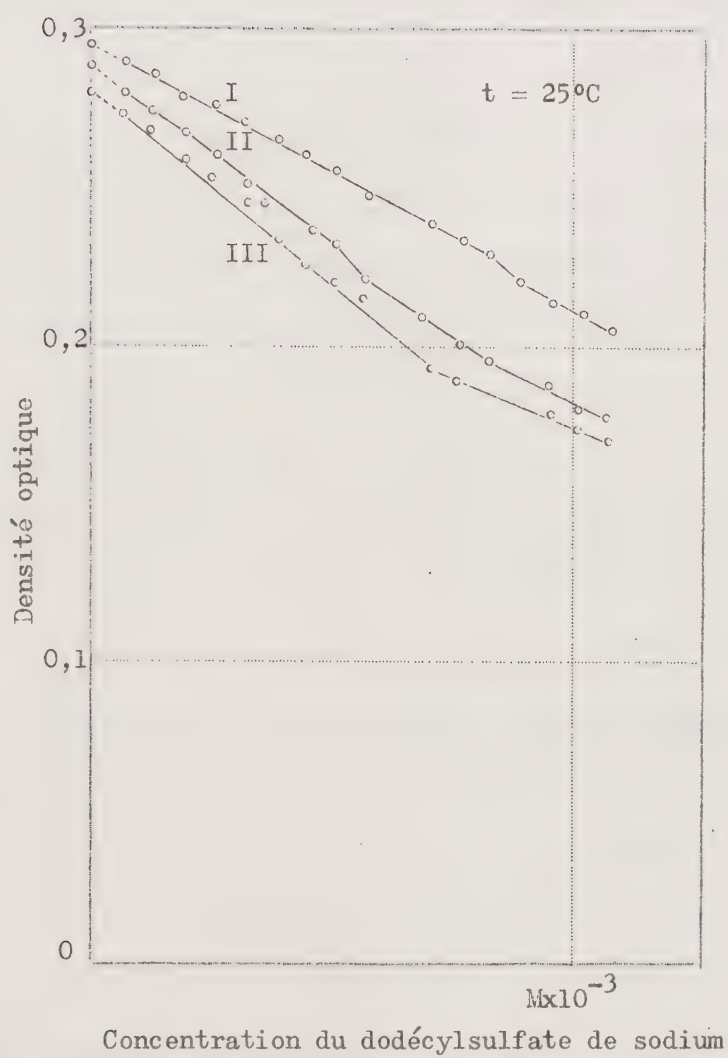


Figure 22.

Légende: voir pp. 64 et 66.

(courbes I). Après 50 minutes (courbes II) et 100 minutes (courbes III) les diminutions de densité sont plus importantes à 18°C qu'à 25°C.

A 30°C et à 35°C la solution se trouble d'autant plus vite que la quantité de dodécylsulfate est plus grande et que la température est plus élevée. Le trouble ne disparaît pas par refroidissement : il s'est formé une substance nouvelle.

En résumé, la phase rapide initiale de l'évolution est insensible aux variations de température. Elle correspond donc à une réaction distincte de celle qui provoque la variation lente du spectre puisque cette variation lente est sensible aux variations de température. La deuxième phase de l'évolution est plus lente à 25°C qu'à 18°C, ce qui suggère que la nature de la réaction à 25°C et des produits formés à cette température est différente de la nature de la réaction à 18°C et des produits formés à cette température. A 30°C et à 35°C il se forme des produits insolubles.

d) - Influence de la concentration en méthémoglobine -

Les essais ont été faits à pH 7,8 et à 18°C dans le même milieu que celui de l'expérience précédente. On a cherché combien de molécules de dodécylsulfate sont nécessaires pour dénaturer en une minute (test du spectre) la quantité de méthémoglobine correspondant à un hème.

Sur la figure 23, on a porté en abscisse la concentration de méthémoglobine et en ordonnée le nombre de molécules de dodécylsulfate nécessaire à la dénaturation. On remarque que la quantité de dodécylsulfate nécessaire croît lorsque la concentration en méthémoglobine décroît. On peut envisager l'explication suivante :

Le dodécylsulfate se fixerait par micelles pendant les premiers

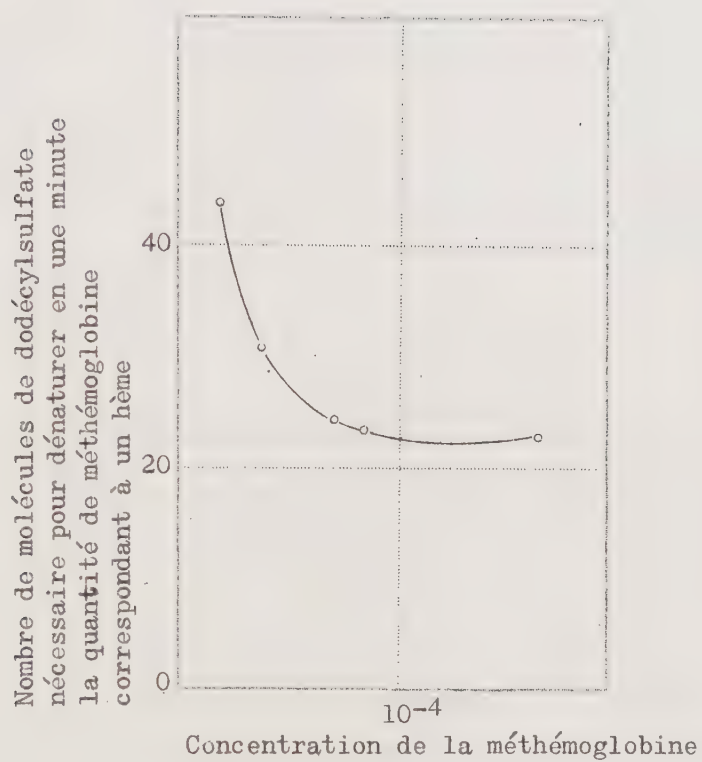


Figure 23.

Légende: voir p. 68.

instants de la réaction à un certain nombre de molécules de méthémoglobine qu'il rencontre. La répartition se ferait ensuite à l'occasion des chocs entre molécules de méthémoglobine. La répartition définitive serait obtenue d'autant plus tard que le nombre des molécules de méthémoglobine est plus petit et que leurs chocs sont moins fréquents. Rappelons à ce sujet que lors de la dénaturation de l'oxyhémoglobine par le salicylate (p. 7 à 14), nous avons constaté que le salicylate a au contraire une action d'autant plus rapide sur l'oxyhémoglobine que la protéine est plus diluée.

C - Essais de réversibilité.

J'ai essayé de séparer le dodécylsulfate de la protéine : L'addition d'un sel de baryum précipite la protéine. L'addition d'alumine transforme la protéine en une substance jaunâtre. L'addition de fortes quantités de sérumalbumine ne modifie pas le spectre si la solution a déjà évolué, mais si la sérumalbumine est ajoutée avant le dodécylsulfate, la dénaturation de la méthémoglobine est fortement ralentie. Le tween 80 qui, ainsi que nous le verrons plus loin, réagit avec l'hémoglobine à forte dose (100 fois le poids de dodécylsulfate) ralentit la réaction s'il est ajouté avant le dodécylsulfate, mais ne l'inverse pas. On verra par contre qu'il est possible d'obtenir de la méthémoglobine native (test du spectre) à partir de la méthémoglobine dénaturée en passant par des formes réduites de la protéine.

D - Essais de séparation des produits formés

Voulant vérifier l'existence de composés définis de la méthémoglobine avec le dodécylsulfate, j'en ai tenté une séparation par électrophorèse. Dans des conditions assez analogues, il avait été possible de fractionner une solution de serumalbumine et de détersif (12). Mais la présence d'urée crée dans la zone de séparation des mouvements de veines liquides. Il s'ensuit un brassage des liquides et l'apparition sur l'écran d'images "en aiguilles". L'électrophorèse sur papier de la méthémoglobine aboutit à une dénaturation rapide même si l'on opère en l'absence d'agents "dénaturants".

Je n'ai pu réussir non plus d'ultracentrifugation : le mélange de méthémoglobine et de dodécylsulfate attaque l'alliage des cellules Spinco que j'avais à ma disposition.

III . HEMOGLOBINE HUMAINE

Il est connu que l'hémoglobine est beaucoup moins sensible aux agents dénaturants que la méthémoglobine. En présence de salicylate la réduction de la méthémoglobine dénaturée conduit à l'hémoglobine native.

J'ai étudié : 1° L'action du salicylate de sodium sur l'hémoglobine. 2° L'action du dodécylsulfate. 3° L'action du groupement hydrophile des détersifs.

Préparation de l'hémoglobine

Au cours de mon travail, j'ai utilisé de l'hémoglobine à des concentrations allant de 10^{-4} à 10^{-5} atome de fer par litre. Les produits de dénaturation de l'hémoglobine autoxydables réagissent avec l'oxygène adsorbé sur les parois du récipient. Aussi ai-je préféré, à la méthode de préparation par dissociation de l'oxyhémoglobine dans le vide, la réduction par l'hydrosulfite de sodium en excès : 1 mg par 10 cm³ de solution contenant de 10^{-4} à 10^{-5} atome de fer par litre.

1° Action du salicylate de sodium sur l'hémoglobine

Spectres d'absorption -

J'ai étudié, à la température de 20°C, les modifications du spectre d'absorption en fonction de la concentration du salicylate de sodium. La concentration de l'hémoglobine est $1,125 \times 10^{-4}$ (en atome de fer par litre). La solution tampon à pH 7,1 est une solution de phosphates mono- et disodique contenant 0,16 molécule d'acide phosphorique par litre.

La concentration en salicylate est 0,6 M pour la courbe I, figure 24 ; (cette concentration ne modifie pas le spectre natif) ; pour la courbe II : 0,7 M , pour la courbe III : 1 M.

On remarque sur le réseau des courbes que chacune a quatre points communs avec toutes les autres. Cette propriété est analogue à celle du réseau obtenu avec la méthémoglobine dans le salicylate (p.18). Si on ne considère que le spectre, rien n'est contraire à l'hypothèse d'une seule forme dénaturée. Mais si on laisse évoluer ces diverses solutions, les courbes correspondantes se déforment. Le spectre à deux bandes dans la région verte fait place peu à peu, surtout pour les fortes concentrations en salicylate (0,8 M à 1 M.), à un autre spectre témoignant d'une réaction irréversible. Nous rencontrerons cette deuxième forme spectrale en abondance dans le cas de la myoglobine.

Aux concentrations plus élevées ($2,25 \times 10^{-4}$ atome de fer par litre) l'hémoglobine précipite dans les solutions de salicylate 0,7 M, 0,8 M et M. Le trouble formé disparaît à l'air. L'hémochromogène autoxydable se transforme en méthémoglobine dénaturée plus soluble que la forme dénaturée réduite. Sans doute peut-on attribuer la différence de solubilité à une différence de configuration de la globine. La globine dénaturée quand le fer est réduit serait ainsi distincte de la globine dénaturée lorsque le fer est oxydé. On sait que la globine native de la méthémoglobine se distingue de celle de l'hémoglobine par une différence sensible de la dissociation acide base.

2° Action du dodécylsulfate de sodium sur l'hémoglobine

L'hémoglobine est obtenue comme précédemment. Pendant les expériences, les solutions d'hémoglobine ont été conservées dans les cuves du spectrophotomètre munies de leur bouchon. On avait introduit une quantité suffisante de liquide pour que la cuve déborde légèrement avant sa fermeture ; ainsi, l'entrée d'oxygène est extrêmement lente.

a) La figure 25 (courbe I) montre le spectre de l'hémoglobine initiale dans un tampon au phosphate de sodium 0,05 M en acide phosphorique, à pH 6,7. Le milieu contient 2 molécules d'urée par litre, et la concentration de l'hémoglobine est $2,8 \times 10^{-5}$ atome de fer par litre.

L'autre spectre (courbe II) est celui d'une solution à la même concentration en hémoglobine, mais avec du dodécylsulfate à la concentration totale de 5×10^{-3} molécule par litre. La courbe spectrale a été construite d'après les mesures obtenues une heure après le mélange. Le dodécylsulfate est en excès. En effet, la courbe spectrale obtenue avec 2×10^{-3} molécule de dodécylsulfate par litre coïncide avec la précédente.

b) A un pH plus élevé (7,8) l'évolution du spectre est différente. Il se produit un hémochromogène. Les courbes spectrales s'apparentent avec celles de la figure 24 relatives à l'action du salicylate sur l'hémoglobine. A pH 6,7 il se forme bien de l'hémochromogène, mais il est instable et se transforme en la forme finale. Les courbes spectrales sont analogues à celles de la myoglobine de cheval, représentées sur les figures 27, 28, 29.

A en juger par les spectres d'absorption, la dénaturation de l'hé-

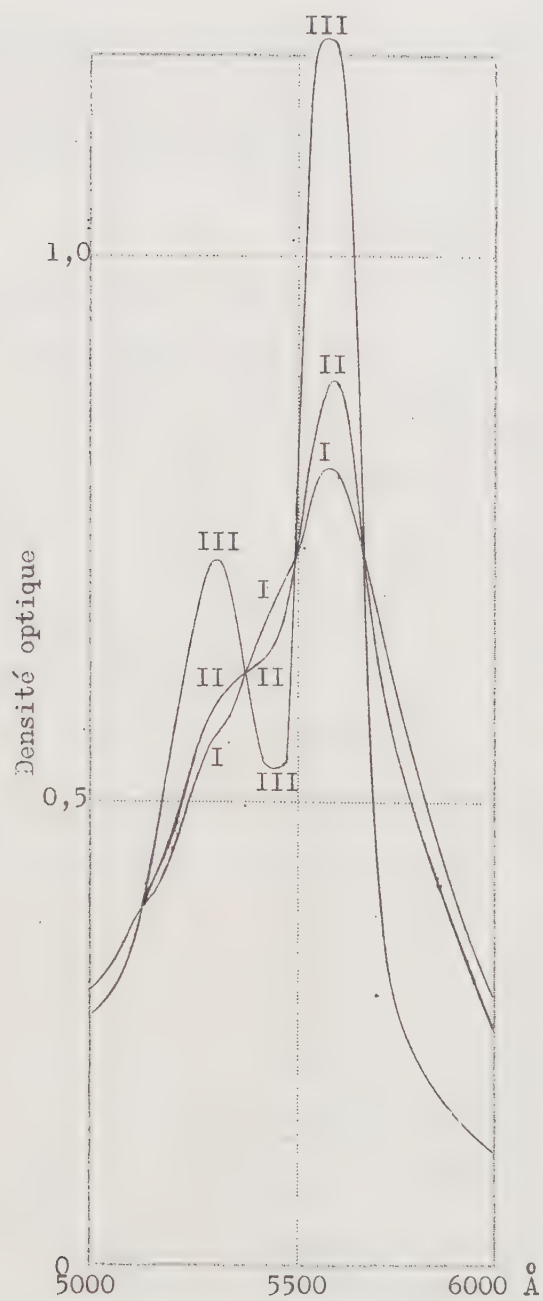


Figure 24.

Légende: voir p. 73.

moglobine par le dodécylsulfate comporte deux stades, alors qu'elle n'en comporte qu'un pour la méthémoglobine.

3° Action du groupement hydrophile des détersifs

J'ai comparé l'action de trois détersifs : le dodécylsulfate , la dodécylamine et le tween 80.

Le groupement hydrophile du dodécylsulfate est chargé négativement : $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$. Celui de la dodécylamine est chargé positivement : $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{NH}_3^+$. Celui du tween 80 est neutre (polyalcool). Le tween 80 n'est pas un corps pur. Il contient des produits d'estérification du sorbitol par l'acide oléique.

Le dodécylsulfate modifie la courbe spectrale de la méthémoglobine et de l'hémoglobine, comme on l'a vu. Je n'ai observé aucune modification par l'action de la dodécylamine. Le tween 80 ne les modifie pas non plus. Toutefois, j'ai observé que le tween 80 présente une propriété intéressante lorsqu'on l'emploie à forte concentration (100 fois en poids celle du dodécylsulfate).

Technique :

L'hémoglobine est utilisée dissoute dans un tampon phosphate 0,16 M en présence d'urée 2 M et de dodécylsulfate (100 molécules pour 1 atome de fer) à pH 7,8. Rapidement les bandes de l'hémochromogène apparaissent au spectroscope. On ajoute ensuite du tween (100 fois le poids de dodécylsulfate). Après agitation, les bandes d'absorption de l'hémochromogène disparaissent de la région verte du spectre et font place à la large bande de l'hémoglobine native. Cette évolution se termine en quelques dizaines de minutes à 20°C. Il s'agit bien de la forme spectrale

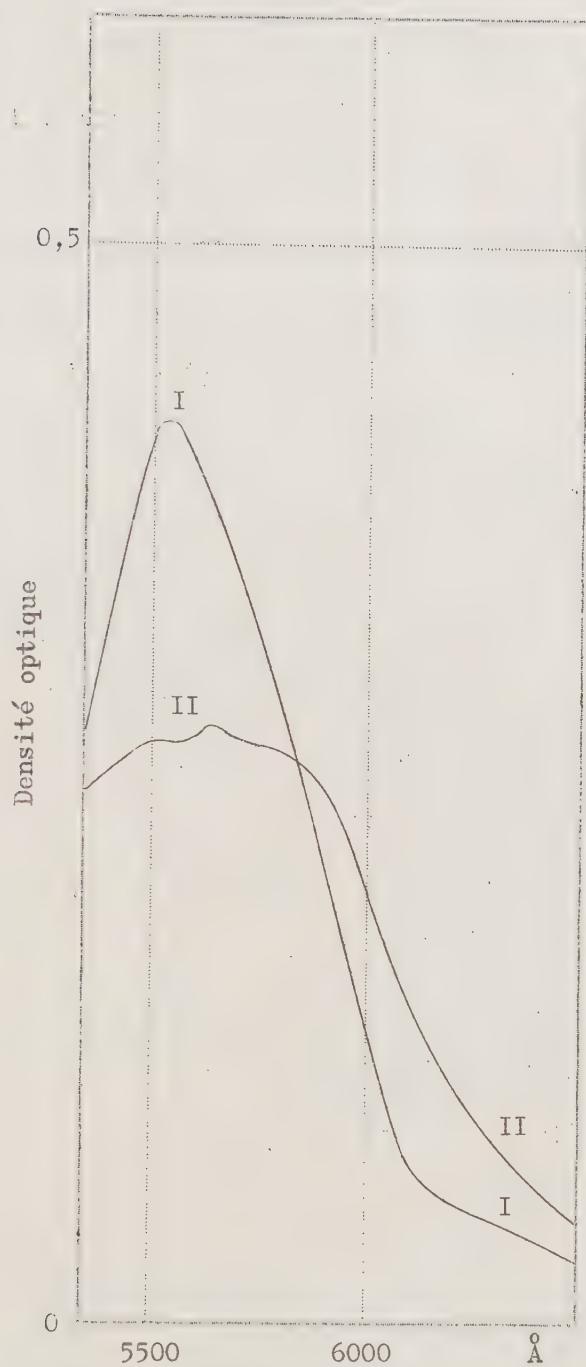


Figure 25.

Légende: voir p. 74.

native, car l'agitation à l'air fait apparaître deux bandes de l'oxyhémoglobine et celles-ci disparaissent par addition d'hydrosulfite de sodium.

D'autre part, la méthémoglobine à pH 7,8 dénaturée par le dodécylsulfate et réduite par l'hydrosulfite en présence de tween 80, se transforme en hémochromogène puis en hémoglobine "native".

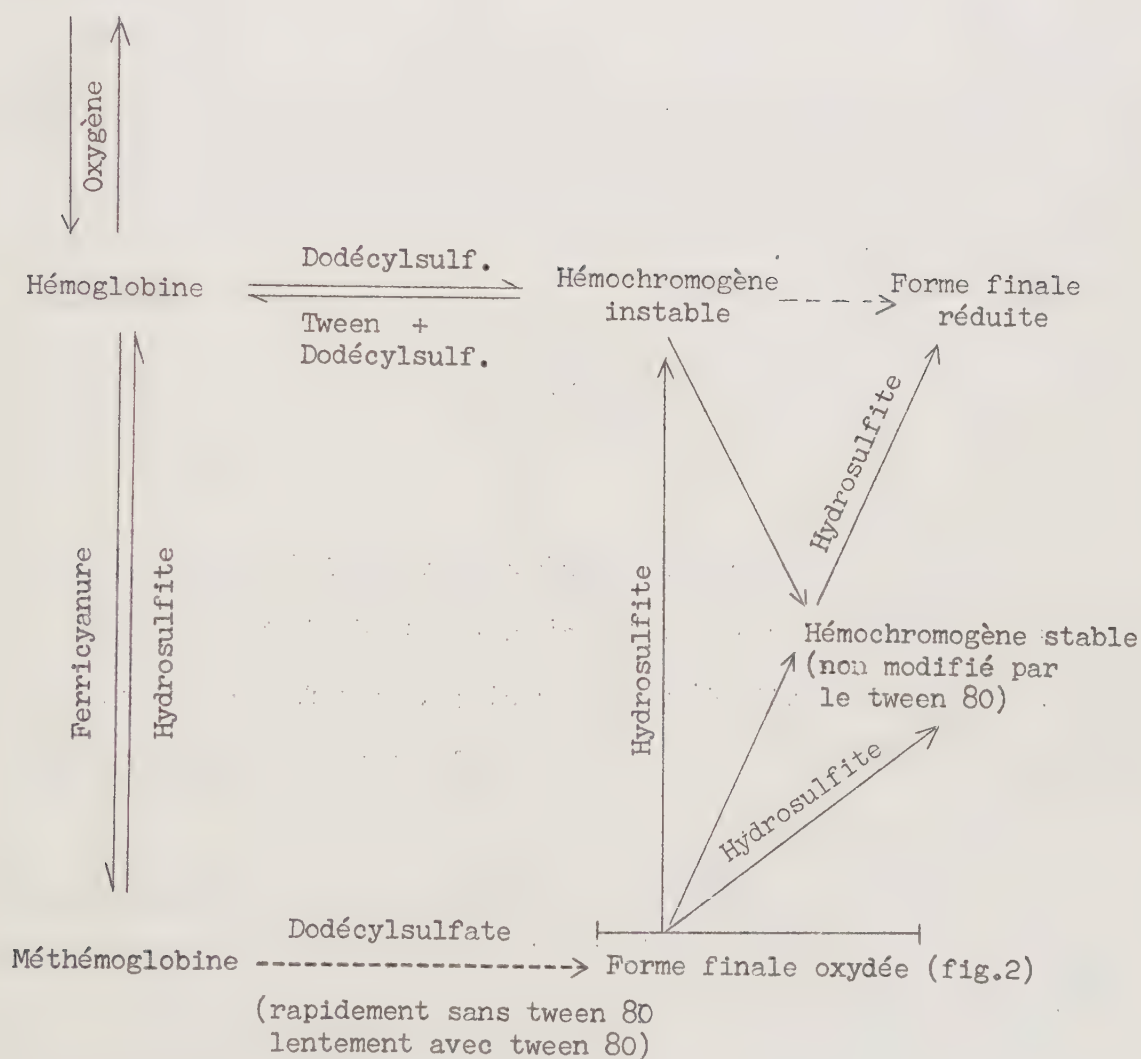
On doit noter que la forme "finale" (figure 25, II) de l'hémoglobine dénaturée obtenue à pH 6,7 n'est pas transformée en hémoglobine native par le tween. De même, à pH 7,8, une partie de l'hémochromogène garde son spectre en présence du tween si la solution d'hémochromogène est préparée depuis plusieurs heures.

En outre j'ai observé, comme on pouvait le prévoir, que le tween 80 empêche la dénaturation de l'hémoglobine par le dodécylsulfate. Il ralentit sans l'éviter la dénaturation de la méthémoglobine par le dodécylsulfate.

L'action du tween 80 m'a permis de classer les produits de dénaturation comme l'indique le tableau IV.

TABLEAU IV

Oxyhémoglobine



MYOGLOBINE DE CHEVAL

Nous allons étudier l'action du salicylate sur les formes oxydée et réduite de la myoglobine de cheval en suivant les variations du spectre d'absorption.

I . METMYOGLOBINEPréparation -

Le muscle cardiaque est disséqué, puis divisé finement dans un broyeur électrique avec un poids d'eau distillée égal au poids du muscle. On sature ensuite d'oxyde de carbone. Par filtration sur un linge, puis par centrifugation, on sépare la pulpe d'un liquide trouble que l'on filtre sur papier.

Le liquide est amené à demi-saturation en sulfate d'ammonium au moyen de sel cristallisé. L'agitation est assurée par un agitateur électrique rotatif et en même temps on sature en oxyde de carbone. On maintient ainsi la myoglobine aussi longtemps que possible sous la forme de carboxyhémoglobine stable. L'oxyhémoglobine se transforme, en effet, rapidement en métmyoglobine fragile qui s'altérerait au cours du frac-

tionnement. On centrifuge et on filtre. On sature à nouveau avec de l'oxyde de carbone et on transporte à la chambre froide (4°C.). Le pH est amené à 6,8 par addition de phosphate disodique en poudre. La saturation en sulfate d'ammonium est obtenue par addition de petites fractions de sel. On laisse ensuite décanter une nuit. On sépare le liquide, qui commence à brunir, d'un précipité riche en cristaux rouges d'oxyhémoglobine et de myoglobine. Le liquide clair est additionné de 50 g. de citrate trisodique pour un litre de liquide et agité de temps en temps. Après un ou deux jours apparaissent des cristaux bruns en aiguilles et en oursins qui sont de la métmyoglobine. Les cristaux, recueillis sur un filtre en verre fritté, sont redissous par addition d'eau distillée, la solution concentrée de métmyoglobine cristallise très facilement par addition d'une petite quantité d'une solution saturée de sulfate d'ammonium.

Action du salicylate de sodium sur le spectre d'absorption -

J'ai étudié le spectre d'absorption en fonction de la concentration en salicylate de sodium. Le spectre a été déterminé dans les conditions suivantes : le solvant aqueux à pH 7,2 contient des phosphates de sodium et la concentration en acide phosphorique est 0,16 M. La concentration de la métmyoglobine est telle que son absorption pour 6.300 Å soit celle d'une solution de méthémoglobine humaine contenant $1,35 \times 10^{-4}$ milliatome de fer par litre. La température est 20°C. Les mesures sont faites 25 minutes après le mélange. L'épaisseur de la cuve est 1 cm.

Sur la figure 26, on a porté en ordonnée les densités optiques, en abscisse les longueurs d'onde. Les concentrations du salicylate

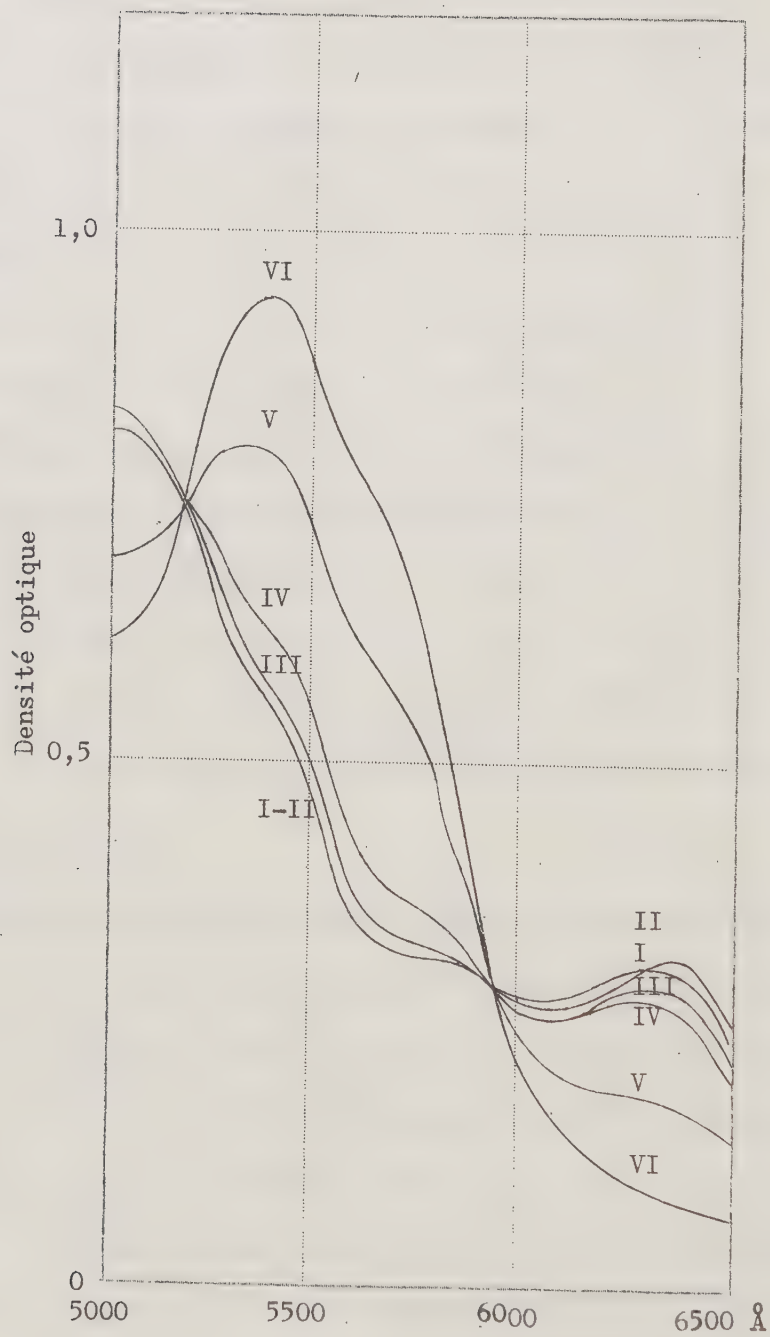


Figure 26.

Légende: voir pp. 81 et 83.

de sodium utilisées sont les suivantes : 0 (courbe I), 0,2 M (courbe II), 0,25 M (courbe III), 0,30 M (courbe IV), 0,4 M (courbe V), 0,5 M (courbe VI). Les courbes spectrales constituent un réseau tout à fait analogue à celui qu'on obtient avec la méthémoglobine (p.17).

On remarque que la courbe IV se distingue assez nettement de la courbe I, alors que les courbes I, II, III, ne diffèrent pratiquement pas les unes des autres : la dénaturation devient sensible pour une concentration en salicylate de 0,30 M (courbe IV), elle est complète pour une concentration de 0,5 M. Rappelons que dans le cas de la mét-hémoglobine humaine la transformation du spectre a lieu entre les concentrations en salicylate 0,2 M et 0,4 M.

II . MYOGLOBINE

Préparation -

On a préparé la myoglobine en ajoutant 5 mg d'hydrosulfite de sodium à 10 cm³ de solution concentrée ($1,5 \times 10^{-3}$ M) de métmyoglobine. Les solutions de myoglobine ont été utilisées aussitôt.

Action du salicylate sur le spectre d'absorption -

Les spectres ont été déterminés dans un tampon 0,16 M en acide phosphorique à pH 7,2. Ce tampon contenait 1 mg d'hydrosulfite de sodium pour 10 cm³. La concentration en myoglobine est la même que celle de la métmyoglobine utilisée pour l'expérience précédente (on a réduit la solution de métmyoglobine). Les mesures d'absorption sont faites à des temps divers après le mélange de myoglobine et de salicylate, la température est 20°C, l'épaisseur de la cuve est 1 cm.

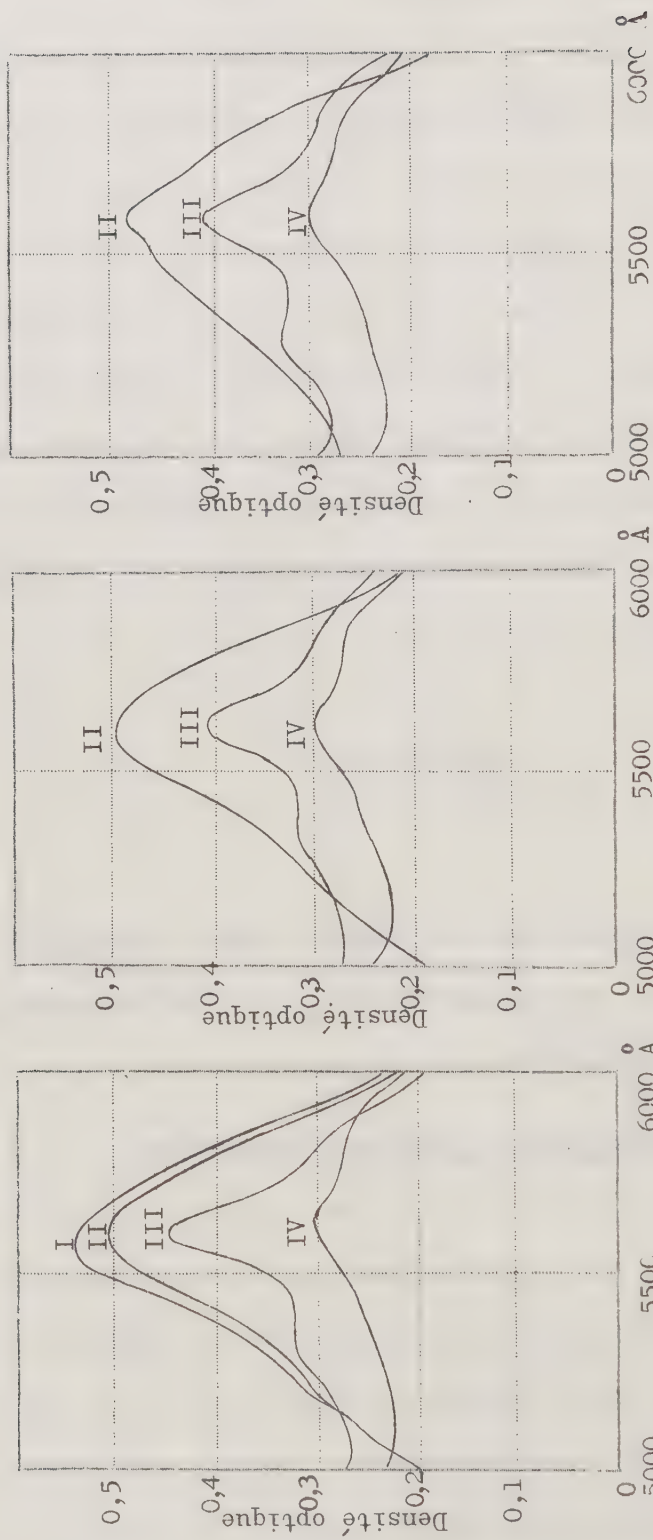


Figure 29.

Figure 28.

Légendes: voir pp. 83 et 85.

Figure 27.

On a suivi au spectrophotomètre l'évolution des solutions. Les courbes de la figure 27 sont déterminées 15 minutes après le mélange, celles de la figure 28, 50 minutes après le mélange, celles de la figure 29, 90 minutes après le mélange. On a porté en abscisse les longueurs d'onde, en ordonnée les densités optiques. Les concentrations de salicylate sont : 0 (courbe I), 0,5 M (courbe II), 0,75 M (courbe III), M (courbe IV). On voit que le spectre de la solution IV a terminé son évolution à la quinzième minute et que celui de la solution III a à peu près terminé son évolution à la quatre-vingt dixième minute.

L'examen de la figure 27 montre que les courbes I et IV ont la même ordonnée pour la longueur d'onde $5.050 \text{ \AA}$. Si nous supposons qu'il y a dans le milieu, outre la myoglobine, une seule autre substance, nous pouvons dire que cette substance formée à partir de la myoglobine a la même densité optique qu'elle pour $5.050 \text{ \AA}$ puisque le passage de l'une à l'autre n'apporte aucun changement dans l'absorption. Mais si l'on compare les courbes I et III, on remarque que le produit formé dans ce cas n'a pas la même absorption que la myoglobine pour $5.050 \text{ \AA}$. Il y a donc plus d'un produit de dénaturation de la myoglobine par le salicylate. Cela est différent de ce qui a été vu pour la métmyoglobine. On peut reprendre ce raisonnement à l'occasion des courbes II, III et IV de la figure 29. On en conclut qu'à la fin même de l'évolution, lorsque les produits instables ont disparu, la nature des produits formés ou du moins la composition d'un mélange possible, dépendent de la concentration du salicylate.

CYTOCHROME C DU BOEUF

J'ai essayé l'action du salicylate de sodium et celle du dodécylsulfate de sodium sur le cytochrome c du boeuf préparé suivant la méthode de Keilin et Hartree (8).

Action du salicylate :

Je n'ai observé aucune action du salicylate sur le spectre d'absorption pour des concentrations de salicylate inférieures ou égales à une molécule par litre, ni pour le cytochrome oxydé, ni pour le cytochrome réduit.

Action du dodécylsulfate :

Le cytochrome c fixe facilement le dodécylsulfate de sodium. J'ai mis en contact des solutions de cytochrome à la concentration 2×10^{-5} avec du dodécylsulfate à la concentration 5×10^{-3} . Le milieu restant limpide, la plus grande partie du dodécylsulfate se fixe à la protéine. Toutefois le spectre d'absorption n'est modifié au début ni si le cytochrome est réduit, ni s'il est oxydé. Pour obtenir une modification de la courbe spectrale, j'ai dû laisser le cytochrome au contact du dodécylsulfate pendant 24 heures à une température de 37°C .

Les conditions des expériences sont les suivantes :

La concentration du cytochrome est $1,8 \times 10^{-5}$ M, celle du dodécylsulfate 5×10^{-3} M. La solution (0,33 M en acide phosphorique) ne contient qu'un cation, le sodium. Le pH est 6,6.

Les mélanges ont été laissés 24 heures en contact à 37°C, l'un des échantillons contenait du cytochrome c oxydé, l'autre du cytochrome c réduit par addition de 1 mg d'hydrosulfite de sodium.

Je ne représente pas ici la courbe du cytochrome c oxydé qui a subi l'action du dénaturant, ni la courbe spectrale de la forme oxydée native dont elle est très peu différente. Mais le cytochrome c dénaturé sous sa forme oxydée donne après réduction (figure 30) une courbe d'absorption (II) distincte de celle du cytochrome dénaturé sous sa forme réduite (III). La courbe (I) correspond à la forme réduite non dénaturée.

On remarque que la courbe spectrale III ne peut être celle d'un mélange des espèces correspondant à I et II parce qu'elle n'est pas située entièrement entre les courbes I et II. On peut en conclure que la réaction avec le dodécylsulfate est différente suivant que le cytochrome est réduit ou qu'il est oxydé.

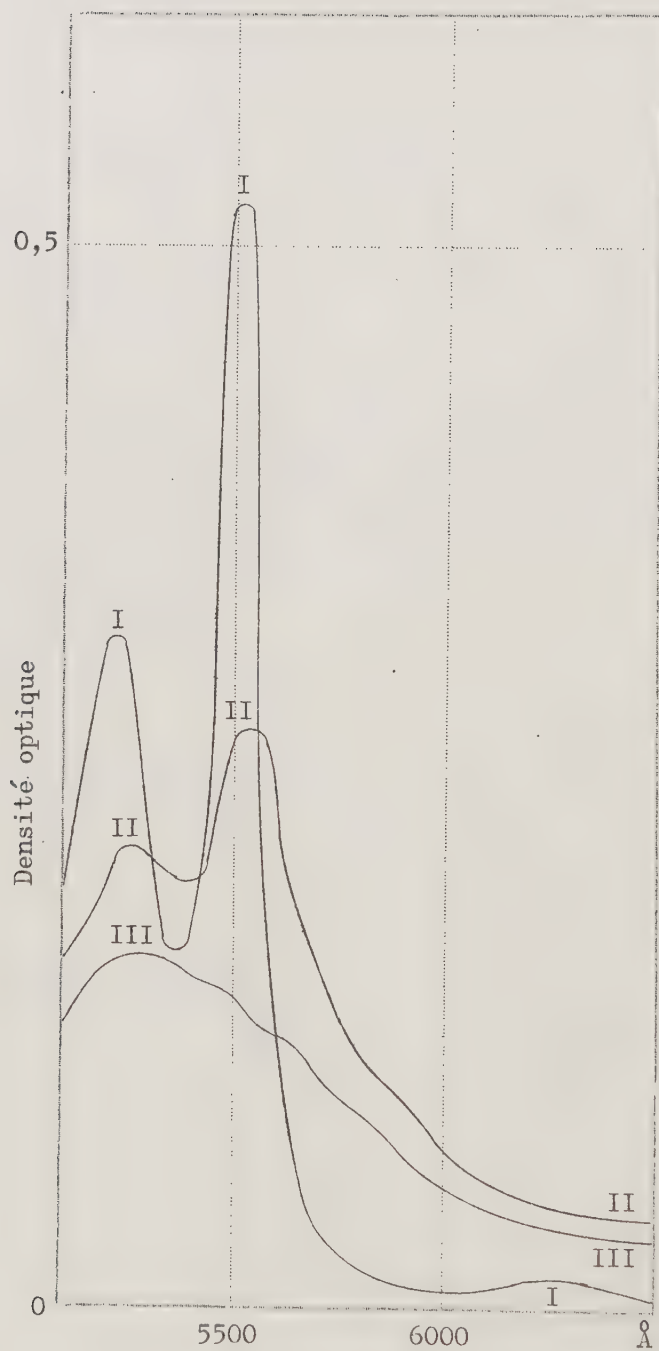


Figure 30.
Légende: voir p. 87.

C O N C L U S I O N S

L'ensemble de ces recherches apporte un certain nombre de faits nouveaux :

1° - La dilution de l'oxyhémoglobine augmente sa sensibilité à l'action du salicylate (p.14). Il est peu probable que l'on puisse attribuer, comme on le fait habituellement, cet effet de la dilution à une influence sur la constante diélectrique ou à des phénomènes de surface. Ici l'action de la concentration en protéine paraît en relation avec une désactivation due aux chocs entre molécules semblables.

2° - Les méthémoglobines humaines dénaturées par le salicylate sont solubilisées par le salicylate lui-même : la protéine dénaturée précipite lorsqu'on dilue la solution dans laquelle s'est produite la dénaturation. D'une manière générale, les méthémoglobines dénaturées par le salicylate sont solubles dans les solutions de ce sel dont les concentrations sont au moins égales à celle de la solution qui a servi à les préparer. Il y a donc plusieurs sortes de molécules dénaturées. Elles se distinguent par leur solubilité (p.26). En outre, certaines méthémoglobines dénaturées donnent des coacervats (p.27).

3° - La méthémoglobine humaine se comporte au point de vue de la dénaturation par le salicylate comme un mélange de protéines. C'est ce que montre l'étude de l'action du salicylate à diverses concentrations (p.30).

4° - Outre la concentration du salicylate, la température joue un rôle notable dans les transformations de la méthémoglobine. Ainsi la méthémoglobine qui a atteint le terme de son évolution à 20°C en présence de salicylate, se distingue par son spectre d'absorption de celle qui a évolué à 30°C (p.40). Les spectres d'absorption de ces solutions restent inchangés si l'on fait ensuite varier la température dans certaines limites : Ainsi la solution qui a évolué à 20°C conserve sa courbe d'absorption si on la porte à 30°C. Le spectre de la solution qui a évolué à 30°C reste le même si l'on abaisse la température à 20°C. Mais il n'en est plus ainsi si l'on refroidit l'une ou l'autre à 4°C : alors le spectre de la solution se modifie (p.47). La courbe d'absorption devient plus proche de celle de la méthémoglobine complètement dénaturée. Elle devient celle qu'on aurait obtenue en enlevant à la solution une certaine quantité de molécules à spectre natif et en ajoutant une quantité correspondante de molécules "complètement" dénaturées par le salicylate. Si l'on porte ensuite la solution de 4°C à 20°C, le spectre évolue en sens inverse, comme si des molécules dénaturées s'étaient transformées en molécules natives. En fait, il s'agit de molécules "pseudonatives". Toutefois la solution ne reprend pas complètement le spectre qu'elle avait avant le refroidissement.

Bien qu'insensibles aux variations de températures au-dessus de

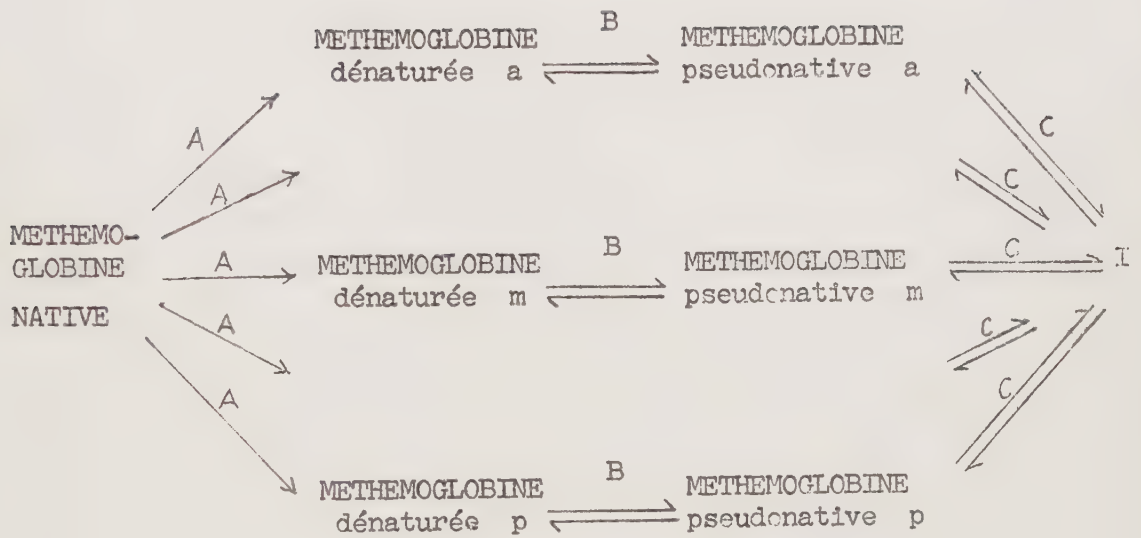
20°C, les solutions de méthémoglobine évoluées en présence de salicylate sont modifiées à ces températures réversiblement quand on fait varier la concentration de ce sel. A une température donnée entre 20°C et 30°C, une variation de la concentration du salicylate modifie réversiblement le spectre d'absorption de la solution. Cela implique que les molécules qui constituent les solutions évoluées en présence de salicylate sont en équilibre entre elles. Mais, comme une variation de la température entre 30°C et 20°C ne produit aucun déplacement de l'équilibre, on peut conclure que la chaleur de la réaction de passage d'une méthémoglobine à spectre de méthémoglobine native ("pseudonative") à une méthémoglobine dénaturée correspondante a une valeur très voisine de zéro.

Il est difficile d'admettre qu'il existe à chaque température une méthémoglobine pseudonative particulière en équilibre avec sa forme dénaturée, on doit cependant penser qu'il existe plusieurs méthémoglobines incapables, aux températures supérieures à 20°C, de se transformer l'une dans l'autre. Les rapports des concentrations de ces substances varient avec la température à laquelle la méthémoglobine a réagi avec le salicylate. La présence dans les solutions évoluées de plusieurs systèmes incapables de se transformer l'un dans l'autre indique qu'il n'y subsiste pas de méthémoglobine vraiment native. En effet, cette méthémoglobine serait en équilibre avec toutes les formes qu'elle peut donner, c'est-à-dire avec toutes les formes présentes ; donc ces dernières seraient toutes en équilibre entre elles. Ce qui n'est pas.

Envisageons maintenant les transformations, à la température de 4°C, des solutions dont la courbe spectrale est devenue stable en pré-

sence de salicylate à 20°C. Comme le spectre d'un système méthémoglobine pseudonative - méthémoglobine dénaturée n'est pas entre 20°C et 30°C modifié par une petite variation de température, la réaction qu'on observe lorsqu'on abaisse la température à 4°C ne peut être que la transformation d'une méthémoglobine "pseudonative" en une autre. Cette transformation est indirecte parce que sa vitesse croît lorsque le nombre des molécules activées décroît ; nulle à 20°C, elle augmente lorsque la température s'abaisse, à tel point qu'après un refroidissement rapide à 4°C, il ne reste plus qu'une petite quantité de méthémoglobine à transformer. Il faut envisager une transformation par étapes. L'un des corps étant capable de se transformer réversiblement en diverses méthémoglobines, les unes dénaturées, les autres pseudonatives. On appellera I ce corps intermédiaire. Sa formation de I est fortement exothermique puisque sa proportion croît très vite lorsque la température s'abaisse.

On a schématisé dans le tableau suivant les diverses réactions qui permettent de passer d'une forme de la méthémoglobine à une autre. Il montre trois types de réactions : l'un, A, transforme la méthémoglobine native en méthémoglobine pseudonative et en méthémoglobine dénaturée. Cette réaction est très lente à 4°C. Le second, B, comprend des réactions de mise en équilibre de chaque méthémoglobine pseudonative avec la méthémoglobine dénaturée correspondante. La position de cet équilibre ne se déplace pas si la température varie. Le troisième, C, n'est observable qu'aux températures assez basses (4°C) . Il correspond à la transformation de méthémoglobines "pseudonatives" en d'autres, et suggère l'existence d'une forme "pseudonative" intermédiaire I. Le



passage de la méthémoglobine en présence de salicylate montre qu'à une même température, il se forme plusieurs méthémoglobines dénaturées. Leur nature dépend de la concentration du salicylate. La comparaison d'expériences faites à diverses températures montre l'existence de réactions sans échange de chaleur : Ce sont des transformations réversibles de méthémoglobine pseudonative en méthémoglobine dénaturée correspondante.

On peut penser que c'est à ce type de réaction que se rattachent celles qu'Anson a étudiées (1) ; (il s'est trouvé, dans le cas de la méthémoglobine de boeuf, que les méthémoglobines formées à chacune des températures étudiées ont les mêmes propriétés optiques).

Il existe aussi des réactions accompagnées d'échanges de chaleur : Elles transforment la méthémoglobine native en méthémoglobine "pseudonative" et des méthémoglobines pseudonatives en d'autres méthémoglobines pseudonatives. Les phénomènes thermiques qui accompagnent ces réactions sont en relation avec les quantités de chaleur que Roberts (13) a mesurées au calorimètre.

5° - L'hémoglobine humaine présente deux formes dénaturées distinctes par leur spectre (p.73). La solubilité à l'état dénaturé, dans les solutions de salicylate de sodium, à la concentration 0,7, 0,8, 0,9 M, est moindre que celle de la méthémoglobine dénaturée dans les mêmes conditions (p.73). L'oxydation du fer modifie donc à ce point de vue la configuration de la globine dénaturée (p.73) de même qu'il modifie, on le sait, sa dissociation acide.

6° - Le cytochrome c dont le spectre n'est pas modifié par le salicylate donne en présence de dodécylsulfate de sodium des produits distincts suivant qu'il a été traité par l'hydrosulfite de sodium avant la dénaturation ou après la dénaturation. Ceci indique que la nature des réactions dépend de l'état du groupement prosthétique comme pour l'hémoglobine (p.87).

7° - Le dodécylsulfate donne avec la méthémoglobine et l'hémoglobine un certain nombre de composés dont les relations mutuelles ont été indiquées dans le tableau IV (p.79). D'autre part, cet agent dénaturant paraît donner avec la méthémoglobine des composés définis (p.59). Certaines organisations de chaînes de dodécylsulfate entre elles confèrent sans doute une stabilité plus grande à un nombre restreint de formes dénaturées.

8° - La myoglobine dénaturée par le salicylate présente au moins deux formes distinctes par leur spectre (p.85) alors que la métmyoglobine dénaturée n'en présente qu'une.

9° - Le tween 80 est un antagoniste du dodécylsulfate. Il a une action "réversante" sur la forme spectrale hémochromogène de l'hémoglobine humaine dénaturée (p.76).

Il apparaît donc que la globine est capable de se présenter sous un nombre considérable de configurations : natives, "pseudonatives", dénaturées. La nature des produits de la réaction dépend de la température, de la concentration de l'agent dénaturant et de l'état du groupement prosthétique fixé à la globine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Anson M.L. et Mirsky A.E., J. Gen. Physiol. 17, 299 (1934).
 2. Anson M.L., J. Gen. Physiol. 23, 239 (1939).
 3. Anson M.L., Adv. in Prot. Chem. 2, 361 (1945).
 4. Chalopin H. et Colson-Guastalla H., Bull.Soc.Chim.Biol. 31, 669 (1949).
 5. Chalopin H., C. R. Soc. Biol. 147, 665 (1953).
 6. Derrien Y. et Reynaud J., C. R. Soc. Biol. 147, 660 (1953).
 7. Symposium - Haemoglobin, London, Butterworths Scientific Publication (1949).
 8. Keilin D. et Hartree E.F., Biochem. J. 39, 289 (1945).
 9. Neurath H.J., Greenstein J.P., Putnam F.W., Erickson J.O., Chem. Rev. 34-35, p.157-265 (1944).
 10. Putnam F.W., dans The Proteins, Neurath H. et Bailey R. Ed., Vol.1, B, p.807 (1953).
 11. Putnam F.W., Adv. in Prot. Chem. 4, 79 (1948).
 12. Putnam F.W. et Neurath H., J. Biol. Chem. 159, 195 (1945).
 13. Roberts, R.M., J. Am. Chem. Soc. 64, 1472 (1942).
 14. Roche J. et Combette R., Bull.Soc.Chim.Biol. 19, 627 (1937).
 15. Roche J. et Derrien Y., Rev. Hématol. 6, 470 (1951).
 16. Roche J., Derrien Y. et Roques M., C.R.Soc.Biol. 146, 689 (1952).
 17. Steinhardt J. et Zaiser E.M., J. Biol. Chem. 190, 197 (1951).
 18. Steinhardt J. et Zaiser E.M., J. Am.Chem.Soc. 75, 1599 (1952).
 19. Waugh D.F., Adv. in Prot. Chem. 9, 325 (1954).
-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
--------------------	---

Chapitre Premier :

HEMOGLOBINE HUMAINE ET SES DERIVES

I . OXYHEMOGLOBINE	5
1°. Préparation	7
2°. Dosage	8
3°. Première série d'expériences	8
4°. Deuxième série d'expériences	10
Microméthode -	
II. METHEMOGLOBINE HUMAINE	15
1° Action du salicylate	15
A - Modifications spectrales	17
B - Solubilité en présence de salicylate	20
Les précipités	26
C - Action du salicylate en fonction du temps	27
D - Réversibilité par dilution du salicylate	36
E - Effets thermiques	39
Réversibilité	40
Montage spectrographique	42
2° Action du dodécylsulfate	49
3° Action du dodécylsulfate en présence d'urée	52
A - Dodécylsulfate en suspension fine	53
a) Quantité de dodécylsulfate fixée	53
b) Le spectre	54

c) Variation de la quantité de méthémoglobine dénaturée en fonction de la quantité de dodécylsulfate utilisée	55
B - Dodécylsulfate micellaire	60
a) Variation de la quantité de protéine dénaturée en fonction du temps	60
b) Variation de la quantité de méthémoglobine dénaturée en fonction de la quantité de dodécylsulfate utilisée	62
c) Influence de la température	64
d) Influence de la concentration en mét- hémoglobine	68
C - Essais de réversibilité	70
D - Essais de séparation des produits formés	71
III. METHEMOGLOBINE HUMAINE	72
Préparation	72
1° Action du salicylate	72
2° Action du dodécylsulfate	74
3° Action du groupement hydrophile des détersifs	76
Chapitre II : MYOGLOBINE DE CHEVAL	
I . METMYOGLOBINE	80
Préparation	80
Action du salicylate	81
II. MYOGLOBINE	83
Préparation	83
Action du salicylate	83
Chapitre III : CYTOCHROME C DU BOEUF	
Action du salicylate	86
Action du dodécylsulfate	86
CONCLUSIONS	89
BIBLIOGRAPHIE	96

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LIAISONS ENTRE STEROIDES ET PROTEINES

Vu et approuvé :

Paris, le 10 Janvier 1956

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

